

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY
KARLOVY V PRAZE**

KATEDRA ANTROPOLOGIE A GENETIKY ČLOVĚKA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Identifikační analýza DNA u dvojčat
DNA analysis of twins**

Monika Fikejzlová

Školitel: Mgr. Vlastimil Stenzl

2008/2009

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, jen na základě použité literatury uvedené v seznamu.
V Praze dne 25.7.2009

Klíčová slova:

Lidský genom (Human Genome)

Variabilita lidského genomu (Variability of Human Genome)

Mutace (Mutation)

Forenzně genetická analýza DNA (Forensic genetic analysis of DNA)

Dvojčata (Twins) - *Monozygotická dvojčata* (Monozygotic twins)

Dizygotická dvojčata (Dizygotic twins)

Semiidentická dvojčata (Polar twins)

Epigenetika (Epigenetics)

Děkuji Mgr. Halině Šimkové a Mgr. Vlastimilu Stenzlovi z Kriminálního ústavu v Praze, za vedení této bakalářské práce. Za jejich ochotu a čas, který mi k této práci věnovali a za jejich cenné konzultace.

OBSAH

1. Abstrakt.....	6
2. Úvod.....	8
3. Lidský genom.....	9
3.1. Lokus, gen.....	9
3.2. Struktura lidského genomu.....	10
3.2.1. Jaderný genom.....	10
3.2.2. Mitochondriální genom.....	11
3.3. Variabilita lidského genomu.....	13
3.3.1. Polymorfismus, alela.....	13
3.3.2. Genotyp a fenotyp.....	16
3.3.3. Variabilita kódujících sekvencí.....	17
3.3.4. Variabilita nekódujících sekvencí.....	18
3.4. Změny sekvence DNA v průběhu života jedince.....	18
4. Forenzně genetická analýza DNA.....	19
4.1. Identita a individualita osobě.....	20
4.2. Principy identifikace osob metodami analýzy DNA.....	22
5. Dvojčata.....	28
5.1. Typy dvojčat.....	28
5.1.1. Monozygotická (identická) dvojčata.....	31
5.1.1.1. Vznik monozygotních dvojčat (twinning).....	31
5.1.1.2. Odlišení identických dvojčat.....	32
5.1.2. Dizygotická (fraternální) dvojčata (vícerčata).....	33
5.1.3. Semiidentická (polární) dvojčata.....	34
5.1.4. Chimérismus, mosaikismus, pseudomosaikismus.....	35
5.2. Genetické mechanismy postihující odlišnosti MZ dvojčat.....	37
5.2.1. Genetické rozdíly na chromozomální úrovni.....	37
5.2.2. Genetické rozdíly na molekulárně genetické úrovni.....	38
5.2.2.1. Mutace.....	38
5.2.2.2. Epigenetické modifikace.....	39
5.2.3. Využití DNA polymorfismů paměťových B lymfocytů v kostní dřeni.....	43
5.2.4. Dvojčata a forenzní DNA analýzy.....	44
6. Závěr.....	46

Seznam literatury	47
-------------------------	----

1. ABSTRAKT

Molekula DNA je nositelkou dědičné informace a od objevení její struktury v r. 1953 je předmětem mnoha výzkumů a studií. V r. 2003 se podařilo vědcům z projektu lidského genomu (Human Genome Project) identifikovat kompletní sekvence genomu. Toto objevení bylo velmi důležité, neboť v příštích desetiletích pomůže k rozvoji genetického zkoumání v mnoha oblastech (farmaceutický průmysl, biomedicína a další). Praktickými výsledky pak budou nové léčebné postupy, lepší diagnostika chorob a výběr léků vzhledem ke genetickému profilu pacienta. K této problematice se také pojí studie dvojčat, které pomáhají zjišťovat podíl genetických a negenetických variabilit lidského genomu u člověka. Monozygotická dvojčata totiž nahrazují u člověka klony, tj. čisté linie, které se využívají v experimentální genetice. Dnes je již jasné, že monozygotická dvojčata nejsou identická vždy, a že za rozdíly ve fenotypu mohou epigenetické faktory. Využití těchto poznatků pro forenzně genetická zkoumání předpokládá zavedení nových metodik, především celogenomového sekvenování. Díky metodám asistované reprodukce se zvyšuje výskyt monozygotických dvojčat v populaci a proto se do budoucna kladou také zvýšené požadavky vyšetřovacích orgánů na jednoznačnou identifikaci biologického materiálu na místě činu.

DNA is a carrier of hereditary information and since its structure was revealed in 1953, it has been the subject of many studies and research. Scientists from the Human Genome Project identified complete genome sequences in 2003. This discovery was very important because it is anticipated to help develop genetic research in many areas (the pharmaceutical industry, biomedicine, etc.) in the next few decades. Practical results will then lead to new medical methods, better disease diagnostics and a wider range of medicines with respect to a patient's genetic profile. Studies of twins are also related to this issue, helping to determine the share of genetic and non-genetic variability of the human genome. The reason being that in humans, monozygotic twins are replacing clones, i.e. pure lines, which are used in experimental genetics. Today it is already known that monozygotic twins are not always identical and that epigenetic factors are responsible for the differences in the phenotype. Application of these findings for forensic-genetic research presumes the introduction of new methods, mainly whole-genome sequencing. Owing to the methods of assisted reproductive technology (ART), the occurrence of monozygotic twins in the population is on the rise and

that presents investigative authorities with an increased demand for undisputable identification of biological material on crime scenes.

2. ÚVOD

Identifikace je termín, který označuje akt nebo proces zjištění nebo prokázání identity ve vztahu k dalším objektům nebo proces zjištění nebo prokázání existence konkrétní osoby.

Identitu osoby můžeme také prokázat pomocí měřitelných biologických charakteristik (např. fyzický vzhled, tvar a rozměr končetin, těla, hlas, otisky prstů a struktura DNA atd.)

Struktura DNA se v současné době stává nejpřesnějším a nejspolehlivějším identifikátorem lidské bytosti. Jaderná DNA obsahuje velké množství informací o každé jednotlivé osobě, je přítomna téměř v každé živé buňce a u každého člověka se liší. Právě odlišnosti ve struktuře DNA dávají kriminalistice a forezním vědám možnost přesně určit danou strukturu DNA a porovnat ji s jiným vzorkem DNA. Jedinou výjimku tvoří proces identifikace monozygotických (MZ) dvojčat, která jsou v současné době klasickými metodami forezní genetiky nerozlišitelná.

Je však známo, že u tohoto typu dvojčat dochází k postzygotickým genetickým změnám, antenatálním enviromentálním změnám a změnám na základě postnatálních enviromentálních faktorů – (*Machin GA (1996) Some causes of genotypic and phenotypic discordance in monozygotic twin pairs. Am J Med Genet 61,216–228.*)

Studie dvojčat přispívají k identifikaci genetických složek řady onemocnění. U těchto studií se zjišťuje konkordance-shoda a dikordance – neshoda mezi jednotlivými dvojčaty pro daný sledovaný znak. Z medicínského hlediska jako je transplantace orgánů mezi dvojčaty nebo např. vyloučení imunosupresivních agents je potom velmi důležitá znalost zygozity zúčastněných dvojčat. Včasné varování před dispozicemi k různým závažným chorobám jako je rakovina může být pro MZ dvojče rozhodující z pohledu další ochrany zdraví.

Problematika určení zygotnosti dvojčat je přímo spojená s rozvojem asistované reprodukce, kdy dochází k jednoznačně zvýšenému výskytu vícečetných těhotenství. Zvýšený výskyt MZ dvojčat v populaci by se mohl v budoucnu tím pádem odrazit ve zvýšených požadavcích vyšetřovacích orgánů na jednoznačnou identifikaci biologického materiálu na místě činu.

3. LIDSKÝ GENOM

Lidská genetická informace je zakódovaná ve dvou genomech: jaderném a mitochondriálním. Oba tyto genomy zobrazují molekulární evoluci již od počátků vývoje živých organismů (cca. 4,5 mld let), přes vznik druhu *Homo sapiens* až do současnosti. Z tohoto důvodu má lidský genom některé vlastnosti, které jsou běžné pro různé skupiny organismů, zatímco jiné vlastnosti jsou unikátní pro druh *Homo sapiens*. (http://actabp.pl/pdf/3_2001/587-598.pdf). Buňka musí zkopírovat celý svůj genom během dělení, aby obě dceřinné buňky nesly stejnou informaci. Lidská DNA je v buňkách sbalena do chromosomů, které vyplňují jádro a následně mohou být rovnoměrně rozděleny do dceřinných buněk. (*Alberts, Základy buněčné biologie 1998*). Pro zachování genetických informací jednotlivých buněčných linií (organismů) do dalších generací je nezbytné, aby transkripce veškerého genetického materiálu obsaženého v buňce byla přesná. Dělení jaderného genetického materiálu obsaženého ve spiralizovaných strukturách – chromosomech probíhá s ohledem na typ dělení tj. pohlavní buňky nebo somatické buňky.

3.1. LOKUS, GEN

Lokus

Každý gen má své unikátní místo na určitém chromosomu a na jeho určité části - toto místo označujeme jako **genový lokus** (<http://genetika.wz.cz/gen.htm>). K zápisu pozice každého lokusu byla vytvořena jednotná nomenklatura. Například: lokus genu může být zapsán "6p21.3", kde "6" je číslo chromosomu, „p“ pozice na krátkém raménku chromosomu a „21.3“ označuje pozici na příslušném raménku.

([http://en.wikipedia.org/wiki/Locus_\(genetics\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Locus_(genetics)))

Ve forenzní genetice se k označení jednotlivých lokusů (časté je také ozn. marker) využívá kromě systematického značení také tradičních (historických) názvů (např. vWA) nebo i nové značení zachycující morfologii některých lokusů (např. Penta D)

Gen

Gen je jednotka dědičné informace. Z molekulárního hlediska jde o úsek nukleové kyseliny se specifickým pořadím nukleotidů, která podmiňuje strukturu a funkce genového produktu. Do jeho struktury patří i regulační sekvence, jako je promotor nebo terminátor, které jsou rozeznávány polymerázami a umožňují tak správné a ohraničené zpracování dědičné informace nesené konkrétním genem. (<http://cs.wikipedia.org/wiki/Gen>) Tyto oblasti se však pro účely genetické identifikace jedince většinou nevyužívají.



Obrázek 1 : Gen, <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gene.png>

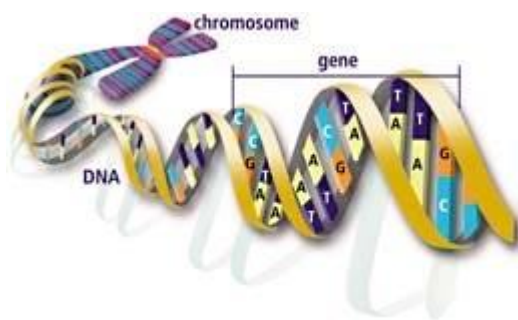
3.2. STRUKTURA LIDSKÉHO GENOMU

Jak již bylo uvedeno, je genetický materiál buňky uložen ve dvou organelách: jádře a mitochondrii.

3.2.1. Jaderný genom

Jaderný genom je složen z $3,2 \times 10^9$ párů bází, které jsou uloženy v 22 párech autozomů a dvou pohlavních chromosomech X a Y. Jednotlivé lidské chromosomy se liší obsahem chromatinu a tím také počtem jednotlivých lokusů. Přesný počet genů kódovaných lidským genomem je stále neznámý. (http://actabp.pl/pdf/3_2001/587-598.pdf) Dříve se předpokládalo, že lidský genom kóduje až 150 tisíc genů, dnes už je ale jasné, že lidský genom představuje pouze třetinu předpokládaného počtu, tj. 30 tisíc genů. (<http://www.tribune.cz/archiv/mtr/204/5632>, *Medical Tribuni 17/2008*). Haploidní lidský genom obsahuje asi 20000 -25000 protein kódujících genů (*Venter et al. 2001, International Human Genome Sequencing Consortium (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome*). Z celkové délky přes 3 miliardy bází pouze 1,5% sekvence kóduje

vlastní bílkoviny, zbytek tvoří RNA geny, regulační sekvence, introny a „junk“ DNA (tzv. odpadní) (*International Human Genome Sequencing Consortium (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome"*). Právě tato oblast hraje nejdůležitější roli ve forenzně genetických analýzách DNA, vedoucích k individuálním a jedinečným genotypům každé lidské bytosti. Je však známo, že ani tato oblast nemusí být dostatečná ke genetickému rozlišení individuí ve speciálních případech jakou jsou právě monozygotická dvojčata.



Obrázek 2 : Molekula DNA , <http://science.howstuffworks.com/genetic-science/dna-evidence.htm>

3.2.2 Mitochondriální genom

Mitochondriální genom je uložen v mitochondriích, což jsou organely eukaryotických buněk, které slouží jako energetické centrum buňky. Obsahují vlastní genetickou informaci a vlastní proteosyntetický aparát. Genom lidské mitochondrie je tvořen kruhovou molekulou DNA (mtDNA) o velikosti 16569 nukleotidových párů (*Anderson et al. 1981*), které kódují celkem 37 genů. Z nich 24 genů kóduje různé části proteosyntetického aparátu mitochondrie (2 typy rRNA a 22 tRNA), zbytek se podílí na malé části enzymatické výbavy mitochondrie. Naprostá většina mitochondriálních proteinů je ale kódována v jádře buňky a do mitochondrie musí být dopraveny z místa vzniku v cytosolu. (<http://genetika.wz.cz/clanky/clanek2.php>). MtDNA má obecně větší mutační rychlost než DNA jaderná. (<http://herkules.oulu.fi/isbn9514255674/html/x287.html>).

Mitochondrie jsou ve spermii obsaženy v oblasti krčku, při průchodu nadvarletem se na ně váže ubikvitin, díky tomu jsou pak zničeny proteasomem při oplodnění vajíčka. V důsledku této skutečnosti je mtDNA děděna matroklinním způsobem tzn. pouze z matky na potomky. Mitochondrie obecně produkují energii, která je v případě spermie využita k pohybu. Při tomto procesu vznikají volné radikály, které mohou také narušit

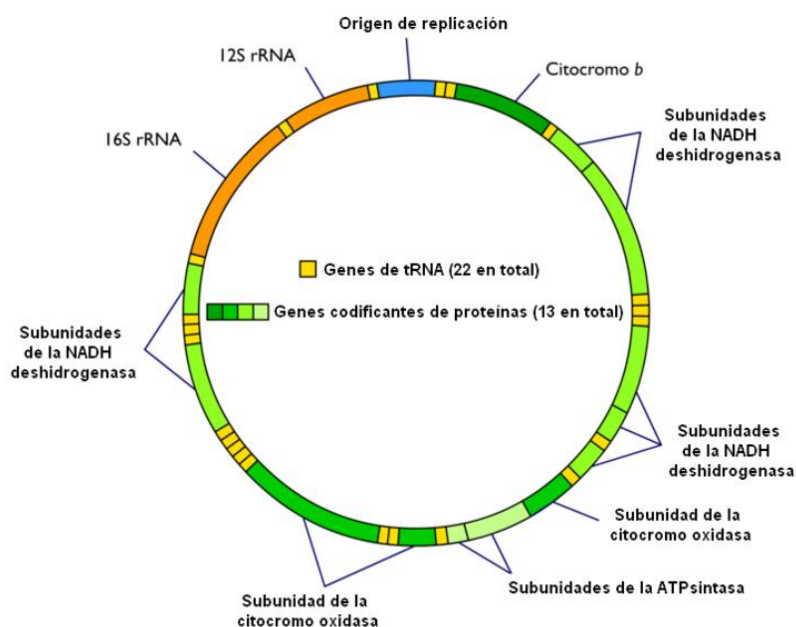
mitochondriální DNA (<http://www.osel.cz/index.php?clanek=2720>). Výsledkem tohoto děje je mnohonásobně větší rozsah genetického polymorfismu ve srovnání s jadernou DNA. (<http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=4401>)

Kromě kódujících sekvencí obsahuje mtDNA nekódující sekvenci, oblast zvanou D-loop (D-smyčka). Je to asi 1100 bp dlouhý úsek, který obsahuje replikační počátek těžkého řetězce H (z angl. Heavy). (<http://www.gate2biotech.cz/variabilita-d-loopu-mitochondrialni-dna/>) Replikace L řetězce (z angl. Light) je umístěna mimo D-smyčku, asi 5.7 kb od počátku replikace H řetězce.

(http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/nemendelovska_dedicnost.htm,

<http://www.gate2biotech.cz/variabilita-d-loopu-mitochondrialni-dna/>) Tato oblast D-smyčky je hojně využívána ve forenzní genetice, díky své vysoké polymorfnosti.

(<http://www.biopticka.cz/sluzby/molekularni-genetika/vyzkum-mtDNA.html>) V současné době jsou však z důvodu větší identifikační schopnosti využívány i polymorfní oblasti mimo hypervariabilní oblast mitochondriálního genomu.



Obrázek 3 : Mitochondriální genom,

[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mitochondrial_genome_\(spanish\).PNG](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mitochondrial_genome_(spanish).PNG)

3.3 VARIABILITA LIDSKÉHO GENOMU

3.3.1. POLYMORFISMUS, ALELA

Genetický polymorfismus

Za geneticky polymorfní považujeme znak s nejméně dvěma geneticky podmíněnými variantami v jedné populaci, které se nacházejí ve frekvencích alespoň 1%. ([http://en.wikipedia.org/wiki/Polymorphism_\(biology\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Polymorphism_(biology))) Základem variability lidského genomu je polymorfismus na úrovni DNA. Tento typ polymorfismu se potom různým stupněm intenzity může projevovat v polymorfismu biochemickém, imunologickém, nebo morfologickém.

Polymorfismus DNA

1/ bodový polymorfismus

Tento typ je způsoben změnou v sekvenci bází, nejčastěji bodovou mutací (většinou záměna nukleotidu, delece či inserce jedné nebo několika bází) v určitém místě DNA. Odhaduje se, že u eukaryot je polymorfní přibližně každý 500. nukleotid v kódujících sekvencích DNA a každý 50. v nekódujících sekvencích.

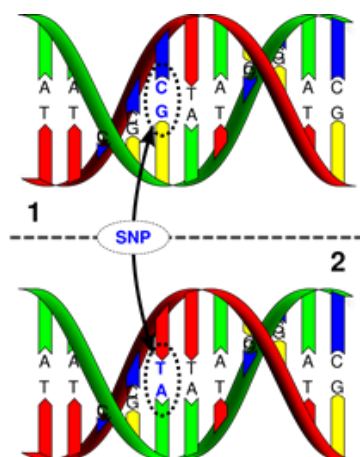
(http://www.zsf.jcu.cz/struktura/katedry/kko/ucebni_texty/zaklady-genetiky-a-poradenstvi/10.pdf)

Bodový polymorfismus se dříve určoval hlavně jako polymorfismus délky restričních fragmentů RFLP (restriction fragment lenght polymorphism).

V dnešní době se vžil pojem polymorfismus jednonukleotidových záměn (z angl. single nucleotide polymorphism- SNP). Protože známe přesné umístění SNP v molekulách DNA, můžeme tak s jejich pomocí umísťovat genové lokusy. V průměru se SNP nachází na každých cca 200 nukleotidů. Tato snadno identifikovatelná místa v lidském genomu umožnila jeho genetické mapování. (*Brdička, Lidský genom na rozhraní tisíciletí 2001*).

Jednou z hojně využívaných technik k určení bodového polymorfismu je využití biočipové technologie. Současné aplikace DNA čipů (microarrays) pro detekci polymorfismů (SNP) jsou založeny na bázi hybridizace oligonukleotidového fragmentu, kdy dochází k hybridizační reakci mezi vzorkem DNA a sekvenčně specifickými DNA sondami, které jsou navázány na povrchu čipu. (http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0602_89.pdf)

Tato metoda využívá několik rozdílných přístupů k hybridizaci, značení a hodnocení výsledků.



Obrázek 4: Polymorfismus jednonukleotidových záměn (SNP – single nucleotide polymorphism) ,

<http://www.dnabaser.com/articles/SNP/SNP-single-nucleotide-polymorphism.html>

2/ repetitivní sekvence

V DNA se vyskytují sekvence unikátní a repetitivní. Unikátní jsou v genomu přítomny v jedné nebo několika málo kopiích. Patří sem geny, okrajové sekvence a spacers.

Jako repetitivní se označují sekvence, které se v genomové DNA vyskytují v mnoha kopiích. Mohou být rozptýlené nebo ve velkém počtu kopií těsně za sebou, v tandemovém uspořádání. Tandemové repetice můžeme rozdělit na středně repetitivní, ty tvoří asi 30% lidské DNA (10-10tis. sekvencí na haploidní genom) a vysoce repetitivní tvořící asi 10% lidského genomu (více než 100tis.sekvencí). Repetitivní sekvence tvoří satelitní DNA (při centrifugaci DNA se vytvářeli pruhy tzv.satelity).(Ferák, Sršeň, *Genetika člověka*, 1990). Funkce většiny satelitů je neznámá a jsou považovány obvykle za odpadní („junk“) DNA.

(http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/repetitivni_dna.htm)

V genomu jsou přítomny ještě mikrosatelitní sekvece (zcela krátké o velikosti 6 párů nukleotidů (bp)) a minisatelitní sekvence (dlouhé 6 HP až několik desítek). (Brdička, *Lidský genom na rozhraní tisíciletí 2001*). Další skupinu tvoří rozptýlené repetice vznikající většinou procesem transpozice segmentu DNA na jiné místo genomu, kdy dochází k molekulární přestavbě určitých lokusů. Rozlišujeme v podstatě dva typy transpozibilních elementů DNA, transpozony: DNA transpozony a retrotranspozony.

DNA transpozony jsou v lidském genomu inaktivní, díky akumulaci mutací v průběhu fylogeneze obratlovců. Můžeme najít pouze jejich evolučně staré zbytky, neboli "fosilie".

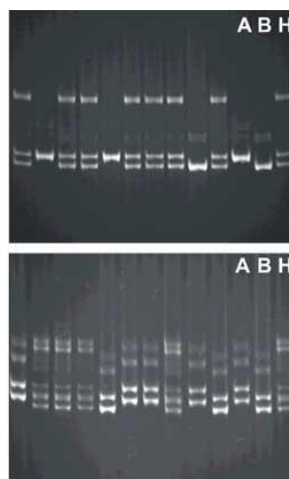
Retrotranspozony jsou aktivní transpozibilní elementy a tvoří nejméně 45% lidského genomu. Pro transpozici používají buněčné RNA polymerázy (II nebo III), kterými jsou přepsány do RNA. Původní kopie zůstává na svém místě a RNA kopie podléhá reverzní transkripci do DNA, ta je pak vložena do genomu na nové místo. Retrotranspozony se dále dělí na autonomní nebo neautonomní. Autonomní retrotranspozony kódují proteiny nezbytné k jejich transpozici. Neautonomní retrotranspozony nekódují proteiny a musí proto využít enzymy jiného transpozonu aby byly schopné transpozice.

(http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/repetitivni_dna.htm)

Nejčastěji rozptýlenou repetitivní sekvencí (neautonomní retrotranspozon) je **Alu-sekvence** (dlouhá 300bp, 300-500tis. kopií na haploidní genom), která tvoří polovinu všech krátkých rozptýlených repetitivních sekvencí s označením SINE (short interspersed repeat sequence). V genomu se ještě vyskytují dlouhé rozptýlené repetitivní sekvence (autonomní retrotranspozon) do 100 tis.kopií na haploidní genom, ty značíme zkratkou LINE (*Brdička, Lidský genom na rozhraní tisíciletí 2001*)

```
ctgcctcatgggacctcactctgacaggtgacata
gcagtggtggcogtgatgaccaagtcacccaaactt
gcaacaggatatacaggagtgatggagaaatgtcc
agggtagttagtgaccatagggggcaggaaaagat
tcatttgaagaaatcagcagcatttcttcttg
gggaaatccacgagcaagtcacatctctggggac
ataacctctcctcactcgtcactcgtcactcgttg
tcgtcgtcaccatcatcaccacatcatcatcatca
tcactcatcatcatcatcatcaaattttatataat
taacgggttccatctctctgattcactatgtgctta
taactattcactgatccagcccccctcttaactcttc
ccccaccttctcacttttagcaaacacgcgttcat
attcagattgacctaaacaaattttcaggtgaaaa
catgcacgattgtttttccggtgtctaggtctctc
catittgtgcaaatggtaggggt

gctgcaggtcgactctagaggatcccccttggtta
ctatggagatgagcattgtctcttgacatttg
tttcagattcattttcttacaagaattcctctccca
agcagaaattcactatattagaccacactgctcgg
gcttcactgttccagtcacccatctttactctc
atctttaattttgcccctctgcaacacacacacaca
cacacacacacacacacacacacacacacacaca
cacacacacactgttccatattccaaacttcaggtt
ttcccttttctgttatctaatcttatcaagteta
ctgatacagtcctcatttcagaaagtatgtagttt
ttttttgtttttgtttgtttgtttgtttgtttgtt
ttgtttgtttgtttgtgcatggatgtat
```



Obrázek 5: Mikrosatelitní sekvence , vlevo je mikrosatelit je označen modře, vpravo je příklad elektroforézy v polyakrylamidovém gelu pro mikrosatelity

http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/genetica_kartografie.htm

Alela

Konkrétní DNA sekvence v daném polymorfním lokusu se nazývá alela. Je to tedy konkrétní varianta genu (<http://cs.wikipedia.org/wiki/Alela>). Diploidní a polyploidní buňky, jejichž chromosomy mají stejnou alelu pro daný gen v určitém lokusu, se nazývají

homozygotní, zatímco ty, které mají různé alely v daném lokusu, se nazývají heterozygotní ([http://en.wikipedia.org/wiki/Locus_\(genetics\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Locus_(genetics))) Na jednom lokusu se v rámci populace může vyskytovat více alel. Na lokusu jsou alely přítomny v párech, protože chromosomy, na kterých jsou lokalizované geny, se také vyskytují v párech, kromě pohlavních chromosomů u mužů. (Ferák, Sršeň, *Genetika člověka* 1990). U strukturních genů rozeznáváme alely standardní, ty podmiňují normální fenotypový znak (tedy zdravý znak) a alely mutované, které vzniknou mutací sekvence nukleotidů a mohou zapříčinit vznik patologického znaku. (<http://genetika.wz.cz/alely.htm>). V nekodující části lidského genomu většinou jednotlivé alely na lokusech nepodmiňují konkrétní fenotypový projev, nicméně je možné do budoucna předpokládat, tak jak se bude dále rozvíjet poznání struktury lidského genomu, že i tyto variabilní oblasti mohou nějakým způsobem konkrétní znak determinovat, zvláště pak, pokud s ním budou ve vazbě. K tomuto účelu bude jistě využíváno studium polymorfismu DNA u monozygotických dvojčat.

3.3.2. GENOTYP, FENOTYP

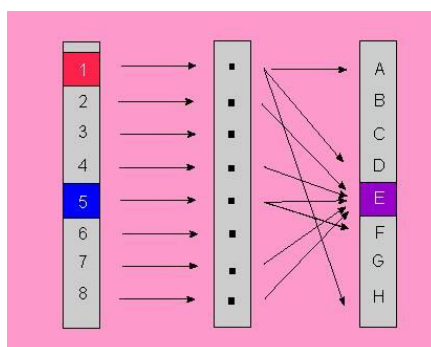
Genotyp

Genotyp je sestava alel konkrétního lokusu. Genotypem se někdy rozumí i soubor definovaných alel z více lokusů nebo i soubor všech genů určitého jedince. Když jsou na obou dvou homologních chromosomech stejné alely, jedinec má (na tomto lokusu) homozygotní genotyp. Když jsou různé, jedinec má heterozygotní genotyp. (Ferák, Sršeň, *Genetika člověka* 1990) Genetická výbava jedince (s výjimkou gamet) je diploidní. Genotyp v užším smyslu je tedy dvojice alel téhož genu, kdy jedna alela z dvojice je maternálního (mateřského) původu a druhá původu paternálního (otcovského). Toto platí pro autozomální lokusy.

Fenotyp

Genový produkt určitého genu – specifický polypeptid – je zodpovědný za vnější projev tohoto genu, tj. tvorbu dědičného znaku nebo choroby. Tento vnější znak se nazývá fenotyp. (Ferák, Sršeň, *Genetika člověka* 1990) V širším pojetí to jsou nejen znaky pozorovatelné a definovatelné na úrovni organismu (např. morfologické znaky jako je výška jedince, hmotnost, počet prstů atp., IQ, chování jedince a další), ale i charakteristika určité fyziologické funkce (např. krevní tlak, hladina cukru v krvi atp.) nebo biochemické funkce (např. isoenzymy). (<http://wiki.lf1.cuni.cz/index.php/Fenotyp>)

Obecně se rozlišují znaky kódované majorgeny a minorgeny. Na znaky kódované majorgeny nemá prostředí žádný, nebo téměř žádný vliv (barva očí, krevní skupiny, struktura bílkovin). Naproti tomu na znaky kódované minorgeny má prostředí velký vliv. (<http://cs.wikipedia.org/wiki/Fenotyp>). Fenotyp je podmíněn genotypem, epigenetickými změnami funkce genů a vlivy prostředí. Epigenetické faktory, tj. vnější činitele fyzikálního, chemického a biologického prostředí, ovlivňují fenotyp bez změny genotypu. Právě tyto faktory mohou hrát velmi důležitou roli při určování identity dvojčat nebo různých projevů chimérismu.



Obrázek 6: Genotyp a fenotyp , v levém sloupci jsou červeně a modře označeny geny, které tvoří genotyp, určují genový produkt, který utváří výsledný fenotyp, označený v pravém sloupci fialově, <http://coturnix.wordpress.com/>

3.3.3.VARIABILITA KÓDUJÍCÍCH SEKVENCÍ

Kódující sekvence (CDS – coding sequence) je část genu, která je transkribována do mRNA a translatována do proteinu. (http://en.mimi.hu/biology/coding_sequence.html). Je to část genové DNA nebo RNA, která je složena z exonů. (Twyman, Richard (1 August 2003) "Gene Structure". *The Wellcome Trust*). Kódující sekvence zahrnuje start a stop kodon, (<http://www.yeastgenome.org/help/glossary.html#cds>) Variabilita kódujících sekvencí zahrnuje i populační variabilitu. Kódující sekvence se podílí na fenotypové variabilitě. Znaky jako např. polymorfismy DNA, krevní skupiny, jsou podmíněny téměř výlučně genetickou variabilitou populace, tedy tím, že jednotliví členové populace mají rozdílné genotypy. Existují i znaky, jejichž populační variabilitu vyvolávají pouze vnější činitele: infekční choroby, následky úrazu atd.

3.3.4. VARIABILITA NEKÓDUJÍCÍCH SEKVENCÍ

Nekódující sekvence DNA není přepisována v protein. Nekódující DNA uvnitř genů je nazývána intron. (http://cs.wikipedia.org/wiki/Nek%C3%B3duj%C3%ADc%C3%AD_DNA).

U nekódujících oblastí se předpokládá selekční neutralita. Jejich míru polymorfismu ovlivňuje pouze genetický drift a snadno se v nich hromadí mutace, proto jsou nekódující sekvence variabilní. (http://www.eamos.cz/amos/bc/externi/bc_154/Markery_Milena.doc).

Introny se vyvíjejí rychleji než exony, tj. při porovnání sekvencí určitého genu mezi rozdílnými druhy, najdeme více substitucí bází v intronech. Substitute v intronech mají nízkou adaptivní hodnotu, neboť téměř neovlivňují funkci genů a v genovém produktu se neprojeví. V nekódujících oblastech DNA nastávají substitute bází častěji než v kódujících sekvencích a to má důležitý praktický důsledek v molekulové diagnostice genetických nemocí. Z tohoto vyplývá, že polymorfismy DNA jsou častější v nekódujících sekvencích. Rychlost molekulové evoluce je nepatrná – u člověka to je řádově 10^{-9} substitucí na nukleotid za rok.

3.4. ZMĚNY SEKVENCE DNA V PRŮBĚHU ŽIVOTA JEDINCE

Změny sekvence DNA (genetické informace) se nazývají mutace. Jsou to dědičné změny v nukleotidové sekvenci nebo v uspořádání DNA. (<http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/prezentace/genom.ppt>) Výjimku tvoří somatické mutace, které nejsou dědičné a nepřenáší se na potomstvo. (<http://cs.wikipedia.org/wiki/Mutace>) Mutace mohou být náhlé, náhodné, neusměrněné změny genetického materiálu, tj. DNA a jejích nositelů. Mutace také patří mezi mechanismy vzniku genetické variability genomu.

(http://www.zsf.jcu.cz/struktura/katedry/kko/ucebni_texty/zaklady-genetiky-a-poradenstvi/12.pdf)

Mutace z vnitřních příčin neboli spontánní mutace může nastat bez zřejmé souvislosti s definovaným vnějším podmětem. Indukovaná mutace naopak vzniká pod vlivem fyzikálních, chemických či jiných faktorů (mutagenů) prostředí. (Sršen, Ferák, Genetika člověka 1990).

Pro genetické rozlišení dvojčat mohou hrát významnou úlohu především mutace rozlišené podle typu buněk: somatické a gametické

- ***Gametické mutace :***

Gametické mutace vznikly v zárodečných buňkách – gametách a jsou jejich prostřednictvím přenášeny do další generace. Projeví se fenotypově v tom znaku, který příslušný gen určuje.

- ***Somatické mutace :***

Somatické mutace vznikají v období po prvním rýhovacím dělení zygoty. Vznikají tedy až v somatických buňkách a přenáší se dále jen na potomstvo (klon) té somatické buňky, v níž vznikly. V takovém případě se hovoří o tzv. genetické mozaice, kdy různé klony buněk (tkáně) nesou různé formy zmutovaných nebo původních alel. Výskyt somatických mutací v buňkách stoupá s jejich stářím, a to jak mutací genových, tak chromosomových a genomových. Zvýšení počtu somatických mutací s věkem má svou příčinu i v nahromadění působení mutagenních faktorů. Toto se považuje i za jednu z příčin stárnutí. (http://www.zsf.jcu.cz/struktura/katedry/kko/ucebni_texty/zaklady-genetiky-a-poradenstvi/12.pdf). Somatický mozaikismus se uplatňuje právě při vzniku mozygotických dvojčat a bude dále popsán.

4.FORENZNĚ GENETICKÁ ANALÝZA DNA

Metody, které umožňují cíleně pracovat s konkrétními lokusy na molekulách DNA, jsou pro forenzní vědu novou cestou, jak využít biologickou individualitu každého lidského jedince k jeho individuální identifikaci podle kriminalistických stop. (http://web.mvcr.cz/archiv2008/casopisy/kriminalistika/2002/02_02/makovec.html)

Nevýhodou této metody, tj. identifikace člověka prostřednictvím DNA, je časové hledisko, technologický postup totiž zabere několik hodin. (Rak, Matyáš, Říha a kol.; *Biometrie a identita člověka*, 2008) Výzkum a rozvoj genetických identifikačních technologií ovšem zaručuje, že v brzké budoucnosti lze očekávat zkrácení doby analýzy a tím i širší uplatnění v oblasti bezpečnostně komerčního využití. Další nevýhodou je relativně vysoká cena analýzy DNA; zanedbat nelze ani potenciální možnost zneužití odebraného biologického materiálu, s čímž souvisí etické otázky ohledně odběru biologického materiálu. Do budoucna je ale metoda identifikace osob prostřednictvím analýzy DNA jednou z nejpřesnějších a nejnadějnějších. (Rak, Matyáš, Říha a kol.; *Biometrie a identita člověka*, 2008)

4.1.IDENTITA A INDIVIDUALITA OSOB

Identita (lat.identitas, odvozené od slova idem – stejný)

Pojem identita, neboli totožnost, se používá tehdy, když porovnáváné pojmy, objekty apod. jsou záměnné takovým způsobem, že mezi ně můžeme klást znaménko rovnosti.

Identita osoby se definuje jako „nezbytná podmínka bytí každé konkrétní osoby“ nebo jako „podmínka být sám sebou a nikým jiným“. Lidská identita je kombinací biologických, psychických, vrozených i získaných individuálních vlastností a schopností vnímat sám sebe. Z tohoto vyplývá, že každý z nás je totožný (identický) právě jen sám se sebou.

Rozdělení podle různých hledisek:

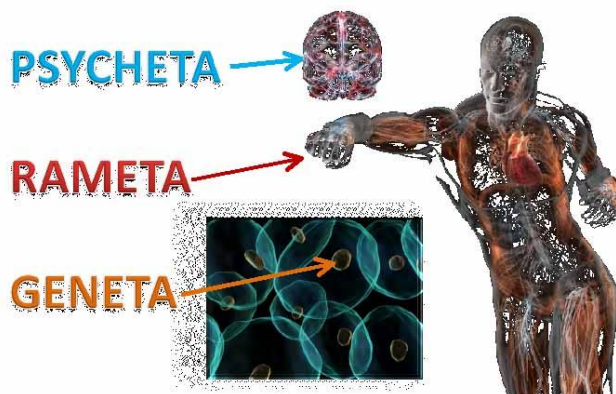
- Biologická identita osoby: dědičné a získané biologické vlastnosti, nezávislé na vědomí člověka, podle nových poznatků je dána lidským genomem, strukturou DNA.
- Identita osoby z hlediska psychologie: totožnost vědomí, člověk si uvědomuje totožnost své osoby, svého já.
- Identita osoby spojená s termíny „osobnost“, „individualita“, „individualismus“ : Lidská identita zaručuje člověku určitý soukromý prostor, ve kterém může dále rozvíjet své životní postoje, názory, skutky.
- Identita sociální: Osoba podle svých projevů, zvyků patří k sociální skupině osob, jejíž členové mají stejné vlastnosti společenské, geografické, jazykové, kulturní apod.

Individuum z pohledu genetiky:

Anatomické, morfologické, fyziologické i psychické vlastnosti jedince jsou dány dvěma základními faktory – dědičnou informací a vlivem prostředí. Např. jednovaječná dvojčata představují typický příklad, kdy genetický základ je zcela shodný a je modelován faktory prostředí, které mohou, ale nemusí být u obou jedinců stejné (např. jedno dvojče sportuje, druhé ne atd.). Z pohledu biologie se tedy jeden jedinec genetický – označuje se **geneta** – vyvíjí jako dva jedinci fyzičtí – označují se **ramety**. Na druhou stranu dvojvaječná dvojčata jsou dvě genety, tj. dva jedinci genetičtí, kteří se vyvíjí současně. (*Rak, Matyáš, Říha a kol.; Biometrie a identita člověka, 2008*)

Individualita:

Pomocí forenzní DNA analýzy se dá individuálně identifikovat DNA jedné osoby od ostatních lidí. Jedinec neboli individuum patří mezi unitární organismy, tzn. že vzniká z jedné buňky, prochází daným vývojem a má relativně přesně danou morfologii. Lidský jedinec je tvořen třemi složkami – 1.**psycheta** neboli psychické „já“, 2.**rameta** neboli fyzické „já“ a 3.**geneta** neboli genetické „já“.(H.Šimková, *Forenzní genetika*)



Obrázek 7: individualita, Mgr.Halina Šimková – forenzní genetika

Variabilita individua

Genetická výbava jedince je jednotná a úplná v okamžiku vzniku oplozeného vajíčka. Dalším vývojem se může rozrůznit. Změna genetické výbavy je trvalá změna některé části molekuly DNA, což může, ale nemusí mít vliv na chování buňky. Naproti tomu diferenciací buněk je vznik různých typů tkání, je to důsledek genové regulace (tzn.řízená tvorba bílkovin) a v těchto tkáních nedochází k žádnému rozrůznění genetické informace.

Typy variability

Mutace jsou hlavním mechanismem rozrůznění genetické informace v DNA. viz.kapitola 3.4.

Lyonizace X chromosomu (neboli spiralizace) – mechanismus genetické variabilizace jedinců ženského pohlaví. Dochází k ní cca 18.den nitroděložního vývoje. V každé buňce se jeden z chromozómů X „sbalí“ a vytvoří tzv. Baarovo tělísko. V tomto stavu sbalený chromosom nemá funkční geny. Který chromosom lyonizuje, zda mateřský nebo otcovský, je dáno náhodou.

Alochtonní (cizorodé) buněčné populace – V těle jedince se vyskytují kromě jeho vlastních buněk i buňky cizí. (např. chimérismus – kapitola 5.1.4., maternální enfragment – kdy se mateřské buňky začlení do vznikajícího jedince, transfuze, transplantace)

4.2. PRINCIPY IDENTIFIKACE OSOB METODAMI ANALÝZY

Identifikační genetika se zabývá převážně nekódující oblastmi genomu, tedy těmi, které nejsou přepisovány do struktury bílkovin.

Metody:

STR – Typing (short tandem repeats)

V současnosti nejužívanější metoda identifikace. Nejčastěji se jedná o STR-typing prostřednictvím PCR – polymerázové řetězové reakce a CE – kapilární elektroforézy. (Rak, Matyáš, Říha a kol.; *Biometrie a identita člověka*, 2008) Tato metoda využívá variabilitu v opakování krátkých sekvencí nukleotidů v určitých úsecích DNA, které označujeme jako markery či lokusy.

(http://aplikace.mvcr.cz/archiv2008/casopisy/kriminalistika/2002/02_02/makovec.html) Jedná se o charakterizaci jednotlivých alel podle velikosti fragmentů.

(http://www.zbio.gnotobio.cz/2007/Molekularni_biologie/P7b_Molbiol_ZBio_2007_2008.pdf)

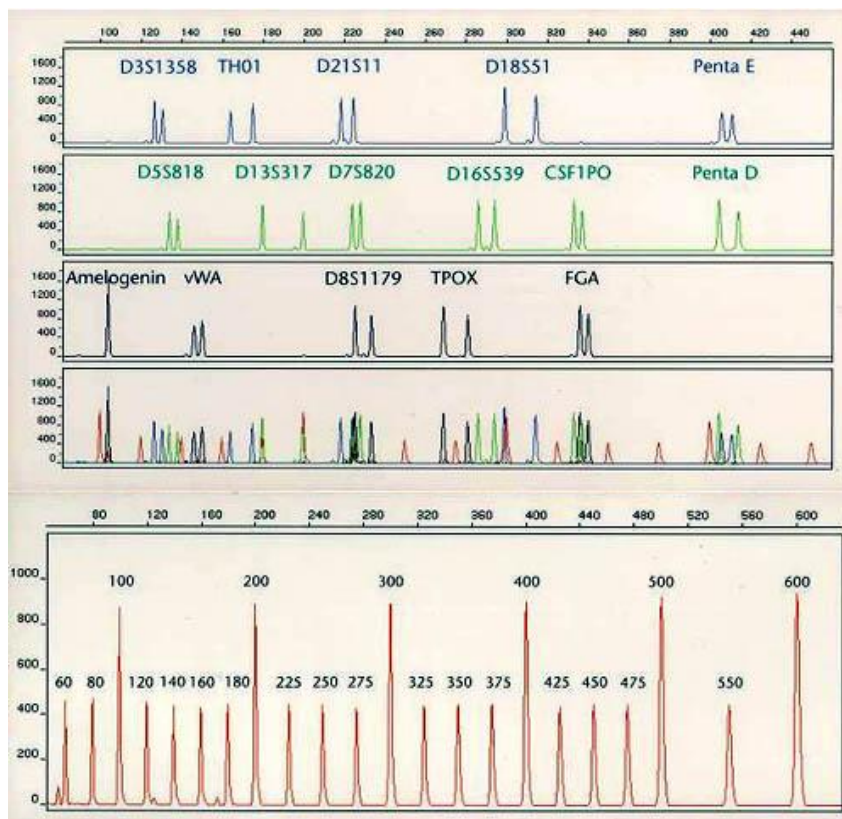
V současné době jsou nejvíce využívány STR polymorfismy tvořené opakováním 4-5 nukleotidů, pro analýzu DNA. (Butler, *Forensic DNA typing* 2001) Ty zaručují vysokou jistotu bezchybných údajů a jsou také odolné vůči nepříznivým vnějším podmínkám. Během analýzy se určuje, jak je vybraná tandemová repetice dlouhá, tj. kolika opakováními nukleotidů je tvořena. K dosažení vysoké rozlišovací schopnosti se testuje více polymorfismů najednou a jejich soubor se označuje jako DNA profil.

(<http://www.uoou.cz/uoou.aspx?menu=0&submenu=287&loc=290>) K identifikaci většinou stačí 9 – 12 polymorfismů STR lokusů (v ČR se stanovuje 16 lokusů). Shoda dvou nepříbuzných jedinců v populaci je asi $1:10^{18}$ po stanovení všech 16 polymorfismů. Žádný ze stanovovaných STR polymorfismů (s výjimkou amelogeninového lokusu) nekóduje významný somatický znak nebo vrozenou vlastnost jedince, proto se nevyužívá při lékařské diagnostice nemocí.

(http://aplikace.mvcr.cz/archiv2008/casopisy/kriminalistika/2002/02_02/makovec.html)

Jedinou výjimkou jsou jednovaječná dvojčata. Ta totiž vznikají z jedné buňky a mají tedy i shodný profil DNA.

(<http://www.uoou.cz/uoou.aspx?menu=0&submenu=287&loc=290>)



Obrázek 8: Ukázka záznamu z přístroje ABI PRISM 310 po rozdělení jednotlivých STR polymorfismů,

http://aplikace.mvcr.cz/archiv2008/casopisy/kriminalistika/2002/02_02/makovec.html

PCR

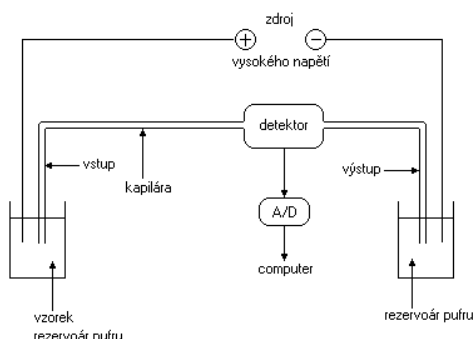
STR typizace používá PCR amplifikaci. Ta vyžaduje jako templát dvouřetězcovou DNA. Ty musejí být delší než úseky vymezené startéry reakce. Pomocí PCR se dá namnožit stopové množství DNA na množství snadno zkoumatelné. (http://www.dnabased.com/DNA_a_urcovani_otcovstvi.htm) Proces probíhá cyklicky a jednotlivé fáze jsou řízeny změnou teploty. To zajišťuje zařízení zvané termocykler. Ke vzorku DNA se přidá směs látek amplifikačního setu, který obsahuje primery (to jsou úseky nasyntetizované DNA, které přesně určují místa startu a ukončení množení úseku DNA)

s vyšetřovanou alelou. Vzniklý produkt tj. amplifikované fragmenty DNA, je pak označen fluorescenčně pro jednodušší vyhodnocení.
(http://aplikace.mvcr.cz/archiv2008/casopisy/kriminalistika/2002/02_02/makovec.html)

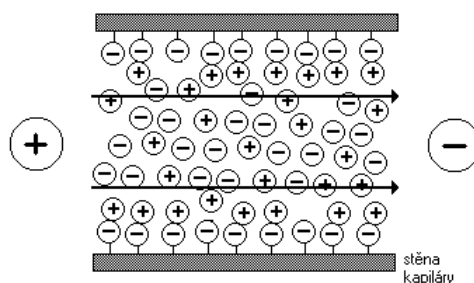
Kapilární elektroforéza – Capillary electrophoresis CE

CE je metoda separace fragmentů DNA. Její výhodou je minimální spotřeba vzorku (1 - 2 μl) amplifikovaných fragmentů, rychlost a snadná vizualizace. (Doc. MUDr. Richard Průša, Csc., *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*) Každá molekula DNA má parciální záporný elektrický náboj (díky svým fosfátovým skupinám), proto se v elektrickém poli pohybuje směrem ke kladné elektrodě. V případě kapilární elektroforézy je tento pohyb omezen statickým separačním médiem - polymerem. Rychlost pohybu molekuly DNA je závislá na její molekulové hmotnosti, větší molekuly putují médiem pomaleji. Vzorek s namnoženými fragmenty umístíme na počátek kapiláry naplněné polymerem. Necháme jej skrz ni putovat v elektrickém poli, tím dojde k separaci. Nejkratší fragmenty dorazí na konec kapiláry jako první, dlouhé až později. Jejich průchod je na konci kapiláry detekován laserem.

Princip: primery používané při PCR jsou fluorescenčně značeny, tzn. že po osvětlení světlem určité vlnové délky emitují záření o jiné vlnové délce. Součástí všech fragmentů je takto označený primer. Výsledkem této tzv. fragmentové analýzy je elektroforetogram v němž jednotlivá lokální maxima označují jednotlivé alely. Pomocí speciálních softwarů za využití známých délek jednotlivých amplifikovaných DNA fragmentů (alel) v populaci je možné přesně určit, o kterou alelu daného lokusu se jedná. (Rak, Matyáš, Říha a kol.; *Biometrie a identita člověka*, 2008)



Kapilární elektroforéza



Elektroosmotický tok kapilárou

Obrázek 9: Kapilární elektroforéza, <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>

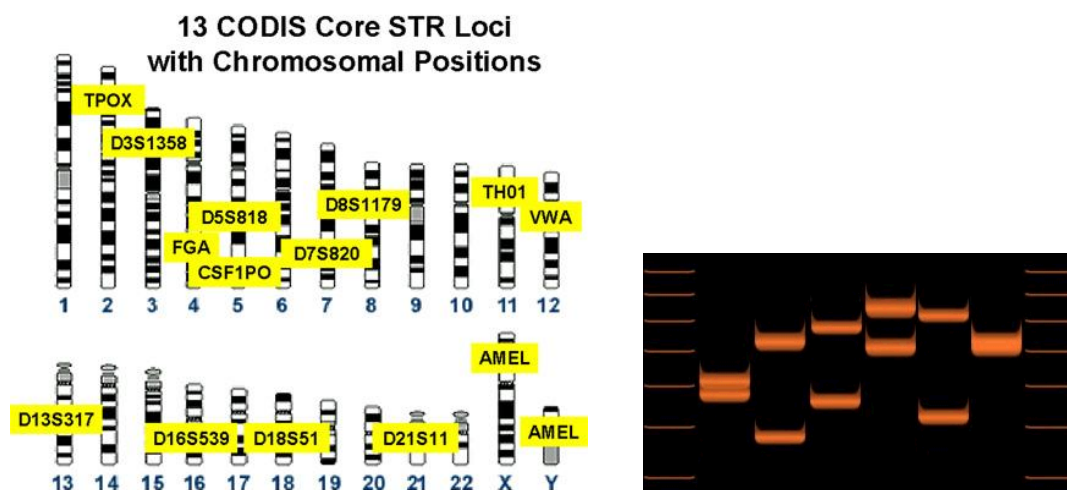
VNTR (variable number of tandem repeats)

Při větší molekulové hmotnosti DNA molekul se k detekci VNTR alel (až 20 000bp) používá RFLP technika. Jednotlivé alely jsou charakterizovány velikostí fragmentu v závislosti na počtu repetice nebo intenzivou při štěpení, které oddělí jednotlivé repetice.

Princip: Cílová DNA je štěpena podle počtu opakování dané sekvence restriční endonukleásou v místě A za vzniku dvou různě dlouhých Variabilita alel spočívá v opakování počtu určitého motivu, který se projeví ve výsledné délce alely. Každý jedinec získá různý variabilní počet tandemových opakování od otce a matky.

Využití: DNA-otisk pro testování otcovství a identifikace osob v kriminalistice. (http://www.zbio.gnotobio.cz/2007/Molekularni_biologie/P7b_Molbiol_ZBio_2007_2008.pdf) Nevýhody této metody jsou časová náročnost a pracnost, vysoké riziko ovlivnění výsledku vyvolané sekundárním působením na DNA.

(http://web.mvcr.cz/archiv2008/casopisy/kriminalistika/2002/02_02/makovec.html)



Obrázek 10: levý obrázek označuje chromosomální lokaci 13 VNTR lokusu a pravý obrázek označuje délkovou variaci VNTR (D1S80) aleli u 6 jedinců

http://en.wikipedia.org/wiki/Variable_number_tandem_repeat

HLA (Human leukocyte antigen)

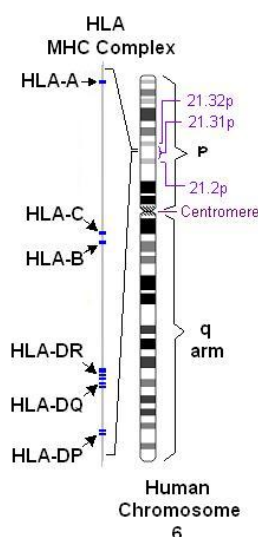
HLA systém je hlavním histokompatibilním komplexem (MHC) u lidí, nachází se na krátkém raménku 6.chromosomu. U každého jedince jsou přítomny vždy dvě alely, maternální – zděděná od matky a paternální – zděděná od otce. Geny kódující HLA oblast se dědí jako celá sada tzv. haplotyp. HLA komplex je již plně vyvinut v 6.týdnu nitroděložního

vývoje.

(http://www.tigis.cz/alergie/Alergie%2002_2006/WEB/PDF_web/10_macurova_web.pdf)

Antigeny systému HLA jsou produkty genů ze série vázaných lokusů MHC oblasti. Dělí se na HLA A, B, C, D. Oblast D je složená ze čtyřech lokusů DP, DQ, DR a DO. Na každém lokusu je větší počet alel. Alely se na lokusech mohou kombinovat. Asi 30 milionů vytváří odlišitelné kombinace antigenů (počet HLA antigenů je cca 150). Jen těžko se dají najít dva nepříbuzní jedinci, kteří by se shodovali ve všech antigenech HLA systému. Takto vysoký stupeň polymorfismu nemá obdobu u žádného jiného genetického systému člověka (výjimku tvoří hypervariabilní minisatelity DNA) (Ferák, Sršeň, *Genetika člověka 1990*) Typizace HLA systému se určuje pomocí metody PCR, protože vyžaduje postamplifikační krok na odlišení různých alel. Typizovaný HLA lokus se namnoží. Pak dojde k denaturaci amplifikovaných produktů a fixace na membrány. K detekci je použito syntetické DNA sondy, která je označena enzymaticky nebo radioaktivně. Jinou obměnou je použití párových primerů, které jsou komplementární k určité alele nebo skupině alel. Když primery lokalizují komplementární úseky, dojde k amplifikaci. Vyhodnocení je pomocí elektroforetické separace kdy se hodnotí přítomnost nebo nepřítomnost specifických PCR produktů.

Další metoda typizování je založena na sekvenci HLA alel. Nejprve se namnoží polymorfní úsek HLA genů a poté se sekvenuje. Získaná sekvence se pak porovnává s databází sekvencí a v případě shody se určí HLA molekula. (Bartůňková, Paulík a kol., *Vyšetřovací metody v imunologii 2005*)



Obrázek 11: HLA oblasti chromosomu 6,

http://en.wikipedia.org/wiki/Human_leukocyte_antigen SNP (Single nucleotide polymorphism)

Analýza je založena na existenci míst, v nichž se mohou vyskytovat drobné jednonukleotidové odchylky. Taková místa jsou roztroušena po celém genomu s četností cca jedno na sto nukleotidů délky. (*Rak, Matyáš, Říha, Biometrie 2008*) Výhodou SNP je že neobsahuje žádné stuterové artefakty, tzn. že tyto markery jednodušeji rozliší několik donorů biologického materiálu ve smíšených vzorcích. Za druhé mohou být potenciálně mutliplexovány na vyšším stupni než STR. Jako třetí faktor je možné zmínit potenciálně vyšší stupeň automatizace samotného genotypování.

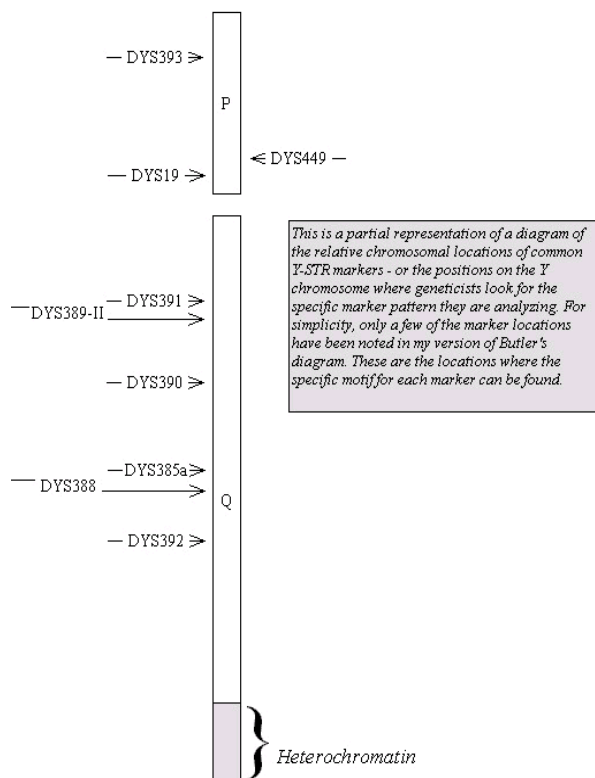
HVR mtDNA (hypervariabilní oblast mitochondriální DNA)

Mitochondriální DNA obsahuje nekódující místo, které neobsahuje žádné repetice, ale vysoce variabilní sekvenci tzv. hypervariabilní oblast neboli D-smyčku. (*Rak, Matyáš, Říha a kol.; Biometrie a identita člověka, 2008*) D-smyčka obsahuje dvě oblasti: HV1 a HV2, které se zkoumají PCR amplifikací a následnou sekvenací. Analýza těchto oblastí je založena na amplifikaci. Analýzu mtDNA může ovlivnit jev zvaný heteroplazmie, což je výskyt jednoho nebo více typů mtDNA u jedince. Tyto regiony se liší o 1-3% mezi nepříbuznými jedinci. Metody používané pro jejich odlišení jsou sekvenčně-specifická oligonukleotidová sonda, minisekvenování, gelová elektroforéza. MtDNA je více náchylná ke kontaminaci než jaderná DNA. Výsledky z mtDNA typizace se srovnávají se známými sekvencemi nebo databází. (*Butler, Forensic DNA typing 2001*) MtDNA se dědí jen po matce, není proto tato analýza vhodná k jednoznačné identifikaci jedince. (*Rak, Matyáš, Říha a kol.; Biometrie a identita člověka, 2008*)

Y-STR (short tandem repeats on the Y chromosome) (<http://en.wikipedia.org/wiki/Y-STR>)

Y chromosomová metoda se stala oblíbenou metodou ve forenzní kriminalistice, pro svoji schopnost oddělit a identifikovat mužskou část biologického materiálu ze smíšeného vzorku. Používají se speciální Y-chromozomové primery, které mohou zvýšit šance na odhalení malého množství pachatelovi DNA na pozadí DNA ženské oběti. Použití pro forenzní účely je ale omezeno nedostatkem polymorfních znaků. (*John M. Butler, Forensic DNA typing 2001*)

Locations of Commonly Used Y-STR Markers
adapted from Butler:94



Obrázek 12: Lokace nejčastěji používaných Y-STR markerů na chromosomu Y, <http://www.waitegenealogy.org/dna.htm>

5. DVOJČATA

Výzkum dvojčat je nejčastěji používanou metodou na zjištění podílu genetických a negenetických příčin variability u člověka. Monozygotická dvojčata nahradí u člověka klony a čisté linie, které se na podobné cíle využívají v experimentální genetice. Metodou výzkumu dvojčat se obvykle nezískají žádné informace o mechanismu dědičnosti sledovaných znaků. (Ferák, Sršeň, *Genetika člověka* 1990)

5.1. TYPY DVOJČAT

Určování zygotnosti u dvojčat se provádí několika metodami.

- **Morfologické porovnání:** podle celkové fyziologické podobnosti a podobnosti v detailech se dá určit zygotnost dvojčat.

- **Vyšetření plodových obalů:** Monoamniotická dvojčata vznikají rozdělením zárodečného listu v období, kdy už je diferenciován amnion (10.-15-den po oplodnění). Vždy jsou MZ a patří sem 5% všech MZ dvojčat. Když se nerozdělí vůbec vznikají siamská dvojčata.
- **Monochoriálně-diamniotická dvojčata:** Oddělí se po vzniku moruly nebo blastocysty, ale před vznikem amnia (mezi 5.-10.dnem). Všechny jsou MZ a patří sem 2/3 MZ dvojčat.
- **Dichoriální dvojčata:** mají společnou nebo každé samostatnou placentu. Sem patří všechny DZ dvojčata. U MZ dvojčat, která se rozdělí ve stádiu moruly (před 5.dnem) je to 1/3.
- **Výpočet číselné pravděpodobnosti zygotnosti:** Používají se geneticky determinované znaky, např. pohlaví, krevní a sérové skupiny, izoenzymové varianty, antigeny HLA systému atd. Když se znaky neshodují jde o DZ dvojčata.
- **Pozitivní určení MZ dvojčat:** využívá se standardních typizačních technik, které jsou používané ve forenzní praxi. Dnes nejvíce využívanou metodou určení zygotity je PCR-amplifikace krátkých tandemových repetit (STR), pomocí komerčně dostupných kitů obsahujících chemikálie potřebné k determinaci až 15 autozomálních, nevázaných lokusů a pohlaví určující marker amelogenin. Dvojčata jsou určena jako MZ když všechny tyto markery jsou identické. V některých studiích bylo využito kombinace genetických i antenatálních environmentálních faktorů (jako chorionicita, twin-twin transfúzní syndrom, rozdílná porodní váha) k rozlišení zygotnosti dvojčat.

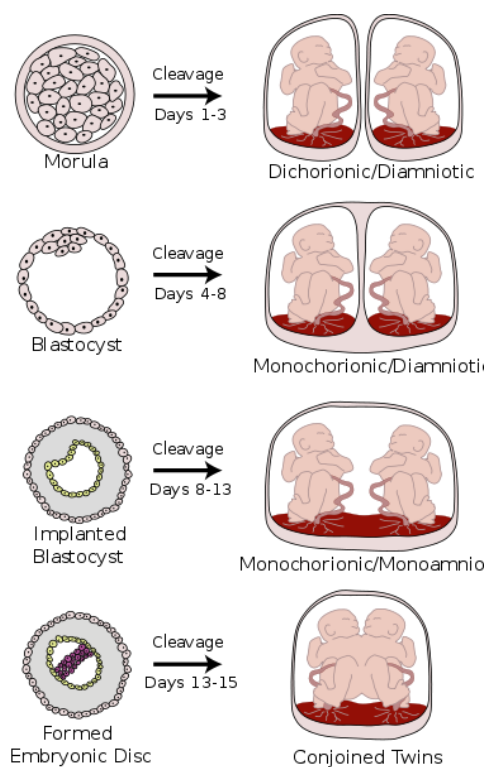
Anastomická spojení mezi fetální cirkulací krve jsou přítomná v 90% monochoriálních placent. Tyto spojení mohou vyústit v **transfúzní syndrom dvojčat** (twin to twin transfusion syndrome) tzn. že jedno dvojče je donorem, druhé recipientem. Donorové dvojče je podvyživné a vzrůstá riziko retardace, zatímco u recipientního dvojčete se může vyvinout srdeční hypertrofie nebo polycythémie (nadbytek červených krvinek).

Různá porodní hmotnost u dvojčat. Ta je způsobena buď nerovnoměrným přísunem živin nebo nerovnoměrným rozdělením vnitřní buněčné masy během vzniku dvojčat. Ze 73 párů dvojčat, z nichž 48 bylo počato asistovanou reprodukcí a 25 normálně, byly 3 ze 48 párů a 18 z 25 párů dvojčat MZ. Chorionicita a placenta jsou zkoumány až po porodu. Z 16 monochorionických dvojčat bylo 11 MZ a 5 DZ. Z 52 případů dichorionicity bylo 9 MZ a zbytek DZ. Frekvence STR v lidském genomu je odhadována na 400 000 (1 STR je 10kb).

Monochorionicitu, jedna placenta a pohlaví dvojčat jsou základními faktory pro hodnocení monozygosity, zvláště v prenatálním období. (*Human Reproduction Vol.21, No.8 pp.2175-2179, 2006 – Determination of twin zygosity using a commercially available STR analysis of 15 unlinked loci and the gender-determining marker amelogenin – a preliminary report*)

Porovnáním konkordance MZ a DZ dvojčat můžeme odhadovat poměr genetické a negenetické determinace daného znaku. Platí, že pokud nalezneme větší konkordanci mezi MZ dvojčaty ve srovnání s DZ dvojčaty, ukazuje to na přítomnost genetické složky sledovaného znaku. Pokud konkordance mezi MZ dvojčaty naopak není úplná, signalizuje to úlohu negenetických faktorů. (u jedné studie bylo zjištěno, že když byla opět vyšetřena skupina MZ dvojčat patnáct let po původní studii, 76% párů původně klasifikovaných jako diskordantní pro daný znak se stalo konkordantními.)

(http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/genetika_komplexnich_znaku.htm)



Obrázek 13: Typy chorionicity a amniocity u dvojčat , <http://en.wikipedia.org/wiki/Twins>

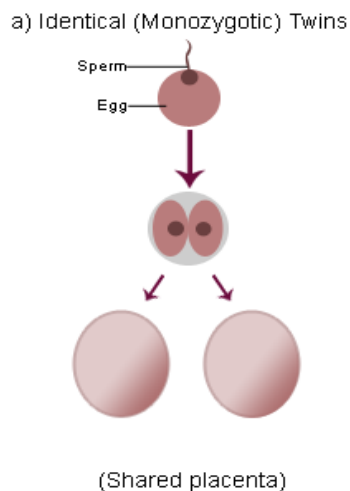
5.1.1. MONOZYGOTICKÁ (IDENTICKÁ) DVOJČATA

5.1.1.1. Vznik monozygotních dvojčat (twinning)

Pro genetické odlišení dvojčat, např. i pro forenzní účely, je důležitá už samotná separace zygoty vznikající z jednoho oplozeného vajíčka ve dvě oddělená embrya .

Na době, kdy dojde k odseparování embryí závisí charakter konkordance - shody a diskordance - neshody uvnitř páru dvojčat pro sledovaný znak, např. diabetes. Toto načasování může být charakterizováno rozdíly v amniotickém vaku, anatomickém formování choriových klků a placenty (*Machin G, Keith L. Biology of twins and other multiple pregnancies. In: Machin G, Keith L, editors. Atlas of multiple pregnancy: biology and pathology. New York: Parthenon; 1999. p. 13– 24*). Obecně platí, že čím dříve se rozdělení zygoty ve dvě monozygotická dvojčata objeví tím méně společných znaků budou MZ dvojčata mít. Extrémním případem pozdního twinningu je vznik siamských dvojčat, které mají některé orgány společné.

Monozygotická dvojčata mají všechny geny identické, takže jejich koeficient příbuznosti je 1. Jednovaječná dvojčata vznikají jako následek rozdělení zygoty (genety) na dvě či více ramet, už ve velmi raném období rýhování oplodněného vajíčka nebo v období blastogeneze. Vzniknou dva či více jedinců se stejným genotypem, které z genetického hlediska představují klony. Frekvence vzniku jednovaječných dvojčat je 0,35 -0,4% . V některých stavech můžeme frekvenci MZ dvojčat experimentálně zvýšit teratogeními činiteli (např. hypoxií), taková to dvojčata jsou tzv. „kongenitální malformací“. Obě MZ dvojčata jsou stejného pohlaví. (*Ferák, Sršeň, Genetika člověka 1990*) Většina MZ dvojčat (60-70%) sdílí jednu placentu, ale má oddělené amniotické obaly. U tohoto typu dvojčat se může vyvinout twin-to-twin transfúzní syndrom. 18-30% MZ dvojčat má každý svoji placentu i amniotický obal. 1-2% MZ dvojčat sdílí jednu placentu i jeden amniotický obal. Při nerovnoměrném rozdělení zygoty může dojít k expresi jiného pohlavního fenotypu např. XXY Klinefelterův syndrom. (<http://en.wikipedia.org/wiki/Twin>)



Obrázek 14: Identická (monozygotická) dvojčata , <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Identical-fraternal-sperm-egg.png>

5.1.1.2. Odlišení identických dvojčat

MZ dvojčata se vyskytují v rozsahu 1 na každých 250 narození celosvětově. Prevalence monozygotických dvojčat je podobná ve všech etnických skupinách a nezáleží na věku matky. Může být ale 2 – 3 krát vyšší po výkonech in-vitro fertilizace, to proto, že při těchto metodách je změněna stavba zony pellucidy (mechanismus toho ale zůstává neznámý). Strukturální fetální defekty, které postihují oba plody jsou charakteristické pro monozygotická dvojčata. Prevalence těchto defektů pro MZ dvojčata je 2-3 krát větší než u DZ dvojčat. Shoda v defektech, kdy jsou postiženy oba plody, není běžná, vyskytuje se u asi 10% bichoriálních a 20% monochoriálních těhotenství. U MZ dvojčat je tedy riziko chromozomálních aberací stejné jako u těhotenství s jedním plodem. Relativní podíl DZ k MZ dvojčatům u bílé rasy je asi 2:1, proto prevalence chromozomálních abnormalit, které postihnou alespoň jedno dvojče je 1,6 krát vyšší než u jednoho plodu.

(<http://www.studiolift.com/fetal/site/FMF-czech.pdf>)

Většina MZ dvojčat jsou si fenotypově velmi podobná, přesto ale existuje množství MZ párů, které si nejsou podobná fenotypově ani genotypově. Za předpokladu kompletního rovnoměrného rozdělení genetických vloh během dělení dvojčat, zůstávají páry identické pokud post-zygoticky **genetické**, post-zygoticky **epigenetické** a post-zygoticky **enviromentální** faktory působí na každé dvojče stejně.

Identická dvojčata jsou ovlivněna multifaktoriální dědičností. Tj. vliv prostřední způsobí, že identická dvojčata nejsou postižena stejně – konkordance je pouze 20-40%. Choroby jako např. diabetes mellitus, vrozené srdeční vady, rozštěpy rtů a patra a další genetické dispozice, vznikají mutací dvou nebo více genů za působení zevních faktorů. Čím více genů vadný znak působí, tím je větší jeho exprese.

(www.fnplzen.cz/data/prac/bory/spau/vyuka/doc/prednasky/vseob/Prehled_lidske_reprodukce_i_patologie.rtf)

Rozdíly nezmámého původu u dvojčat

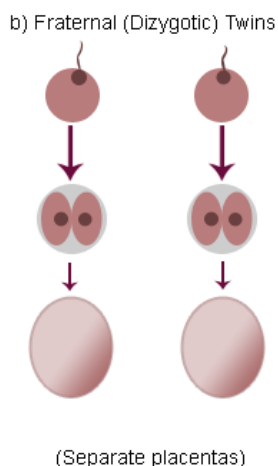
Zrcadlová dvojčata se vyskytují v 25% MZ dvojčat. Dvojčata mohou mít jen opačně situované týlní závitky nebo až kompletně převrácené tělní orgány tzv. situs inversus. Pojem zrcadlových dvojčat se nejčastěji používá u MZ dvojčat s diskordancí pro pravo nebo levo rukost. Vědci nedávno potvrdili pomocí funkční magnetické rezonance mozku, že u MZ dvojčat s diskordancí pro pravo nebo levo rukost se vyskytuje lateralizace hemisféry. Také potvrdili, že toto poznání může zkomplikovat výzkumy u těch nemocí, kde mozková lateralita hraje důležitou roli v jejich patologii (např. schizofrenie, dyslexie, autismus, deprese) (*Early Human Development* 64 (2001) 105– 117, *Mechanisms for differences in monozygous twins*)

5.1.2. DIZYGOTICKÁ (FRATERNÁLNÍ) DVOJČATA

Dizygotická dvojčata se vyvíjejí ze dvou oplodněných vajíček. Z genetického hlediska jsou to dva sourozenci, kteří se narodili současně a překonali intrauterinní vývin ve shodném prostředí. Když dojde během jednoho cyklu k ovulaci 2 vajíček, které jsou oplodněny během dvou různých pohlavních styků vyvíjí se DZ dvojčata. Tento jev se nazývá **superfekundace**. Obměnou tohoto je **parentální superfekundace**, tj. když dojde k oplodnění dvou vajíček uvolněných v jednom menstruačním cyklu spermiemi od dvou různých mužů. DZ dvojčata jsou jen polosourozenci. (Ferák, Sršeň, *Genetika člověka 1990*) Další výjimkou je oplození druhého vajíčka v době, kdy první je už nidováno v děloze. Tento jev se nazývá **superfetace**. (http://www.porodnice.cz/upload/prednasky-kurz5/Hajek_gemini_aktualni_stav_nasich_znalosti.ppt)

Heterotropní těhotenství je typ vzniku DZ dvojčat, kdy jedno se vyvíjí normálně v děloze a druhé ve vejcovodu tzn. mimoděložně. Tento typ těhotenství musí být ukončen. Ze zdravotního hlediska může být pro matku velmi nebezpečné. Výskyt je 1 na 30 000 těhotenství. (<http://en.wikipedia.org/wiki/Twin>) Příčinou vzniku DZ dvojčat je zvýšené

procento dvojitých ovulací. Frekvenci dvojitých ovulací je možné zvýšit gonadotropními hormony. Hladina těchto hormonů stoupá s věkem matky a s počtem porodů. Rozdíly ve frekvenci výskytu DZ dvojčat jsou velké mezi rasami. U žluté rasy to je 0,4%, u bílé 0,8%, u černé 1,5-2%. DZ dvojčata mohou být stejného nebo rozdílného pohlaví. V naší populaci je asi 30% různopohlavných párů. Z toho je 60% DZ a zbytek 40% MZ dvojčat. (*Ferák, Sršeň, Genetika člověka 1990*)



Obrázek 15: Vznik fraternálních (dizygotických) dvojčat , <http://en.wikipedia.org/wiki/Twins>

5.1.3. SEMIIDENTICKÁ (POLÁRNÍ) DVOJČATA

Tento typ dvojčat byl identifikován vědci v roce 2007 v časopise the Journal of Human Genetics. Popisuje dvojčata, která jsou identická z matčiny strany, ale která sdílí pouze polovinu otcových genů. Zatím jsou známy pouze dva případy na světě. Dvojčata narozená v roce 2003 a 2004 v USA. (<http://multiples.about.com/od/glossary/g/semiidentical.htm>) Vzhledem k velmi vzácnému výskytu tohoto typu dvojčat nejsou známy žádné studie jejich odlišení nebo forenzní analýzy.

Sdílejí pouze 75% genů, místo 100% genů. Vyskytují se velmi vzácně. Do jednoho vajíčka pronikly dvě spermie. Jedna nesla pohlavní chromosom Y a druhá X. Místo zárodku se 46 chromosomy vzniklo triploidní embryo se 69 chromosomy s pohlavními X,X,Y. Takové embryo obvykle nepřežije. V buněčném dělení ale došlo k diploidizaci tzn. že embryo redukovalo počet chromosomů na 46 v každé buňce. Jedna buňka nesla dědičnou informaci vajíčka a jedné spermie s chromosomem X, druhá buňka nesla stejnou dědičnou informaci vajíčka a druhé spermie s chromosomem Y. Následovalo dělení a promíchání buněk embrya.

Pak došlo k rozdělení embrya, které vede obvykle ke vzniku MZ dvojčat. Tyto dvojčata nejsou DZ, protože vznikly z jednoho vajíčka, ale nejsou ani MZ, protože u jejich zrodu byly dvě spermie. Těla obou dvojčat tvoří mužské a ženské buňky s pohlavními chromozomy XX a XY. Jedno z dvojčat se vyvíjelo jako hermafrodit, druhé jako mužský jedinec. (<http://www.osel.cz/index.php?clanek=2556>)

5.1.4. CHIMÉRISMUS, MOSAIKISMUS, PSEUDOMOSAIKISMUS

Zvláštním jevem, který se vyskytuje v případech, kdy je třeba provádět genetickou analýzu dvojčat je tzv. chimérismus. Chiméra je organismus, který je tvořen dvěmi nebo více různými genotypy, často jako následek transplantací nebo při embryonálním vývoji, kdy kmenové buňky jednoho embrya jsou zachyceny jiným embryem geneticky odlišným. Rozlišení MZ dvojčat je v tomto případě problematické, neboť striktně řečeno, každá genetická různorodost je klasifikována jako mosaikismus. Nicméně někteří autoři používají termín chimérismus pro přenos kmenových buněk z jednoho dvojčete na druhé, jestliže toto nastalo během jejich vzniku. Např. dvojče A se mírně geneticky odlišuje od dvojčete B, a dvojče B má některé kmenové buňky od dvojčete A. Mosaikismus tedy popisuje různé buněčné linie, které vznikly jako výsledek mutace uvnitř jednoho dvojčete po rozdělení dvojčat.

U monochorionických dvojčat, které sdílejí jednu placentu, se může vyskytnout transfuzní syndrom a kmenové buňky tak mohou být přenášeny z jednoho dvojčete do druhého pomocí placentárních anastomóz. Toto může být označováno jako pseudomosaikismus nebo chimérismus. Např. během fetálního vývoje jsou kmenové buňky jednoho dvojčete přenášeny do kostní dřeně. Pro genetické porovnání monochorionických MZ dvojčat je důležité provádět genotypování tkáně (např. kožní fibroblasty), nestačí spoléhat jen na krevní lymfocyty.

Např. Studie monochorionických dvojčat diskordantních pro trisomii 21. V této studii byl objeven pouze jeden karyotyp ve fibroblastech u každého z dvojčat (jedno s normálním karyotypem a druhé s Downovým karyotypem), ale v krvi (a v kostní dřeni) byl objeven u obou dvojčat. To naznačuje přítomnost chimérismu v krvi a kostní dřeni, ale ne v somatických buňkách.

Mosaikismus může vzniknout během raného vývoje jako mitotická chyba při dělení buněk. Výsledkem je směs buněk s různými karyotypy (např. směs 45,X a 46,XY buněčných linií v Ullrich-Turnerově syndromu (UTS) pohlavně diskordantních MZ dvojčat). Byl zaznamenán případ MZ dvojčat s UTS ženským a normálním mužským fenotypem. Muž se vyvíjel normálně do svých 21 let, měl dvojí kožní fibroblastové kultury a dvojí lymfocytové kultury ukazující nesomatický 45, X karyotyp. (*Rogers et al. Monozygotic twins discordant for trisomy 21, Journal of Medical Genetics; 1982,11143-6*)

Zygotický chimérismus vzniká oplodněním diploidního vajíčka dvěma spermii nebo oplodněním haploidního vajíčka jednou spermií a pólóvého tělíska druhou spermií, případně splynutím dvou vzniklých zygot do jediné moruly. Příkladem přirozeného vzniku postzygotického chimérismu u člověka jsou erytrocytární chiméry, ty vznikají u DZ dvojčat s kříženou placentární cirkulací. (*Ferák, Sršeň, Genetika člověka 1990*) 8% dvojvajíčných dvojčat a 21% trojčat jsou chimérické pro krevní populaci.

(http://www.img.cas.cz/mi/prednasky/Mother_fetus_interaction.ppt)

- **Tetragametická chiméra** vzniká ze čtyř gamet. Dvě vajíčka jsou oplodněna dvěma spermii. Tato fáze je podobná vzniku DZ dvojčat. Dojde ovšem ke splynutí a promíchání buněk obou těchto zárodků.
- Chiméra, která vznikla ze zárodků s karyotypem 46 XY a 46 XX může mít různě vyvinuté pohlavní žlázy (existuje i smíšená pohlavní žláza ovotestes tzn.vaječníky i varlata). Taková chiméra se nazývá **pravý hermafrodit**. (<http://genetika.wz.cz/clanky/chimera.php>)
- Chiméra vzniká i pomocí tzv. **maternálního engraftmentu**, kdy oplodněné vajíčko jednou spermií splyne s děložní sliznicí matky. Vzniká jedna rameta, která je chimerická.
- Dalším typem chimerismu je **fetální mikrochimerismus**, kdy embryonální buňky dítěte osidlují tělo matky. Již od 4. týdne těhotenství.
- Existuje ještě **posttransplantační chimerismus**. Vzniká transplantací kostní dřeně, jedinec má tedy v těle dvě buněčné linie s odlišnou genetickou informací, která pochází z různých jedinců. (*H.Šimková – Forezní genetika*)

V medicíně se dnes již běžně používají tzv.**xenografty**, tedy buňky, tkáň nebo orgány jednoho druhu, které jsou implantované do jiného druhu (např. z prasete do člověka).

Takto mohou vzniknout mezidruhově chiméry u člověka.

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Xenograft>)



Obrázek 16: Chimérismus , <http://www.osel.cz/soubory/kabinet/omne5.ppt>

5.2. GENETICKÉ MECHANISMY POSTIHUJÍCÍ ODLIŠNOSTI MZ DVOJČAT

Geneticky je možné monozygotická dvojčata odlišit

1/ na chromozomální úrovni – tzn., že počet a morfologie chromozomů se může u jednotlivých dvojčat lišit

2/ na molekulárně genetické úrovni - kdy je možné nacházet rozdíly v primární struktuře DNA nebo pomocí tzv. epigenetických struktur

5.2.1. GENETICKÉ ROZDÍLY NA CHROMOSOMÁLNÍ ÚROVNI

MZ dvojčata mohou mít rozdílnou chromosomální kompozici (heterokaryotypii). Dobře zdokumentovaný je případ pro diskordanci MZ dvojčat s výskytem Ullrich-Turnerova syndromu (UTS). Jedno z dvojčat je fenotypově muž a druhé je fenotypově žena s Turnerovým syndromem. Tato diskordance vzniká jako následek ranné post-zygotické mitotické chyby při dělení buněk. V důsledku toho je jedno dvojče 47,XYY nebo 46, XY nebo mosaika 45,X/46,XY (mající za následek fenotypově muže) a druhé dvojče je 45,X nebo mosaika 46,XY/45,X (mající za následek fenotypově ženu s Ullrich-Turnerovým

syndromem). Načasování vzniku této mitotické chyby určuje přítomnost a stupeň mosaikismu u jednoho nebo u obou dvojčat.

Např. MZ dvojčata diskordantní pro Downův syndrom (trizomie 21) nebo Klinefelterův syndrom (47,XXY) nejsou běžná, přesto byl popsán jeden případ výskytu monochorionických MZ mužských dvojčat. Zajímavé bylo, že dvojčata nebyla mosaikami v případě fibroblastů, ale měla směs buněk v krvi. Teoretické vysvětlení je, že Downův a Klinefelterův syndrom se běžně vyskytuje jako chyba v pre-zygotickém vývoji, zatímco UTS jako chyba v post-zygotickém vývoji. (Perlman EJ, Steeten G, Tuck-Muller CM, Farber RA, Neuman WL, Blakemore KJ, et al. *Sexual discordance in monozygotic twins. Am J Med Genet* 1990;37:551–7)

Prevalence strukturálních defektů pro každý z plodu u dizygotických dvojčat je shodná jako u těhotenství s jedním plodem. Prenatální diagnostika chromosomálních abnormalit je složitější, protože techniky testování mohou poskytovat nejisté výsledky a mohou být spojeny s vyšším rizikem potratu. Plody se navíc v abnormalitách mohou lišit. Strukturální fetální defekty, které postihují oba plody jsou charakteristické pro monozygotická dvojčata. Prevalence těchto defektů pro MZ dvojčata je 2-3 krát větší než u DZ dvojčat. Shoda v defektech, když jsou postiženy oba plody, není běžná, vyskytuje se u asi 10% bichoriálních a 20% monochoriálních těhotenství. U MZ dvojčat je tedy riziko chromosomálních aberací stejné jako u těhotenství s jedním plodem. Relativní podíl DZ k MZ dvojčatům u bílé rasy je asi 2:1, proto prevalence chromosomálních abnormalit, které postihnou alespoň jedno dvojče je 1,6 krát vyšší než u jednoho plodu.

(<http://www.studiolift.com/fetal/site/FMF-czech.pdf>)

5.2.2. GENETICKÉ ROZDÍLY NA MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ ÚROVNI

5.2.2.1 Mutace

Vzhledem ke skutečnosti, že jednobodové mutace jsou víceméně náhodný proces, je možné předpokládat, že mohou vznikat u jednotlivých dvojčat nezávisle a tudíž jejich počet i lokalizace bude vzrůstat s věkem. Tyto rozdíly však budou nepatrné vzhledem k celému genomu. Výzkum variability lidského genomu však odhalil úseky DNA, které prochází masivními přestavbami, které se projeví v rozdílném počtu studovaných kopií jednotlivých

úseků DNA. Tento jev známý také jako **copy-number variation** (CNV), který se projevuje zejména u somatických buněk ukazuje rozdíly v genetickém složení i mezi MZ dvojčaty. Vědci studovali 19 párů MZ dvojčat s korekondancí nebo diskordancí pro fenotyp za použití 2 platform CNV analýzy a ukázalo se, že CNV se vyskytuje uvnitř každého páru. CNV analýza může poskytnout mocné prostředky pro identifikaci predispozičních lokusů některých nemocí. Budoucí studie se budou zabývat extrahováním DNA více než jednoho typu tkáně, aby mohly lépe určit fenotypovou diskordanci pro jednotlivé nemoci. (*The American Journal of Human Genetics* 82, 763-771, March 2008 – *Phenotypically Concordant and Discordant Monozygotic Twins Display Different DNA Copy-Number-Variation Profiles*)

5.2.2.2. Epigenetické modifikace

MZ dvojčata jsou využívána k demonstrování environmentálních vlivů na vznik složitých onemocnění a fenotypů, ale podstata těchto diskordancí není stále dostatečně objasněna. Epigenetické změny v genomu mohou být důležitou součástí při řešení tohoto fenomenu a mohly by být využitelné i při forenzních aplikacích zabývajících se problematikou MZ dvojčat.

Hlavním procesem, kde se uplatňuje epigenetický mechanismus, je metylace, která modifikuje expresi sekvence DNA a tím daný expresně aktivní úsek inaktivuje. Toho je dosaženo připojením methylové skupiny k cytosinu v CpG ostrůvcích. CpG ostrůvky jsou skupiny cytosinových a guaninových opakování, běžně se nacházející blízko genově kódujících DNA oblastí. Druhou oblastí, která se uplatňuje při epigenetických procesech na molekulárně genetické úrovni je acetylace histonů, která je všeobecně spojená s aktivací genů. (www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0504743102). Methylace CpG má dva efekty. První zahrnuje predispozici k substituci na TpG, která nahrazuje kódující sekvenci vedoucí ke vzniku abnormálního proteinu. Druhý efekt zahrnuje vlastní metylaci CpG ostrůvků, která je asociována s kontrolou genové exprese .

Histony na sebe vážou DNA a umožňují tím sbalovat a rozbalovat vlákna DNA. „Obnažený“ gen umožní jeho zapnutí a vypnutí a tím tedy reguluje genovou aktivitu. Genovým regulátorem je v tomto případě molekula demethylázy. Geny, které se zapínají v nesprávném čase (tedy z nesprávného místa DNA), jsou charakteristickým znakem rakovinových buněk. Předpokládá se, že demethylázy se stanou cílem léčebných procesů a pomohou nám zbavit se některých typů rakoviny.

(<http://osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=1349>)

Metylace se také uplatňuje při nadbytku X chromosomu u žen – proces zvaný inaktivace X chromosomu nebo také Lyonizace. Ve většině případů Lyonizace je náhodný proces. Inaktivace X chromosomu může být „nenáhodná“ u některých individuí, X chromosom zděděný po otci je přednostně inaktivován. Někteří autoři se domnívají, že tato nenáhodná inaktivace se více vyskytuje u MZ dvojčat ženského pohlaví. S rozvojem moderních technik bude možné určit počet případů této nenáhodné X inaktivace a MZ fenotypovou diskordanci mezi dvojčaty tj. nemoci spojené s expresí X chromosomu u žen. (fragilní X syndrom, barvoslepost, hemofilie B,...) (*Early Human Development* 64 (2001) 105– 117, *Mechanisms for differences in monozygous twins*)

Stejně jako u DZ dvojčat, tak i u MZ dvojčat je aktivita jejich genů ovlivněna molekulami, které se vážou na povrch DNA (tj. epigenetické změny dědičné informace) Vyšetřením DNA jednovaječných dvojčat se zjistilo, že epigenetický „obal“ DNA, který určuje, jak budou jednotlivé geny pracovat byl u některých dvojic podobnější, u jiných se lišil. Rozhodující moment nastává během vzniku MZ dvojčat. Bylo zjištěno, že čím později se zárodek rozdělí na MZ dvojčata, tím podobnější je pak epigenetický „obal“ DNA těchto dvojčat a tím i podobnější aktivita jejich genů. Tyto epigenetické změny DNA a z nich vyplývající odlišnosti v aktivitě genů, jsou možným důvodem k náchylnosti k některým nemocem, např. rakovina, kardiovaskulární choroby, duševní poruchy atd. (schizofrenie – jedno z MZ dvojčat je postiženo touto nemocí, zatímco druhé je zdravé).

(<http://osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=4230>)

U mnoho nemocí známe genetickou složku, ta ale může být epigeneticky pozměněna. Tyto změny nejsou ale přenášeny na potomky. Zkoumání epigenetických vlastností je využíváno pro léčebné postupy, protože je mnohem jednodušší změnit cestu metylace DNA než změnit původní sekvenci DNA. (<http://epigenome.eu/en/1,4,0>) (<http://www.washingtonpost.com/wp-dyn/content/article/2005/07/04/AR2005070400845.html>)

S epigenetikou je úzce spojena i **monoalelická exprese** u MZ dvojčat tzn. že existují výjimečné případy, kdy v buňkách pracuje jen gen zděděný od jednoho z rodičů, zatímco druhý je „uspaný“. V genetickém kódu DNA se to ale neprojeví. Geny, které podléhají tzv. imprintingu dědíme od jednoho z rodičů vždy aktivní a od druhého vždy inaktivní. Záleží tedy na tom, od koho jsme gen zdědili, protože podle toho pak gen funguje. Případy, kdy imprintované geny fungují oba nebo žádný, bývají většinou fatální nebo vedou k vážným problémům. Proto dokonce i MZ dvojčata s dokonale totožnou dědičnou informací se mohou

nakonec lišit v geneticky podmíněných vlastnostech. Jedno z dvojčat může mít totiž „uspaný“ příslušný gen od matky a druhé naopak „uspává“ gen po otci. Byla prokázána monoalelická exprese v buňkách placenty nebo v bílých krvinkách. Poruchy monoalelické exprese mohou vést ke vzniku některých chorob. (např. zvýšená produkce proteinu APP vede k dispozici vzniku Alzheimerovy choroby). Zatím ale není jasné, kdy k monoalelické expresi dochází. Nejpravděpodobněji již v embryonálním vývoji.

(<http://osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=3083>)

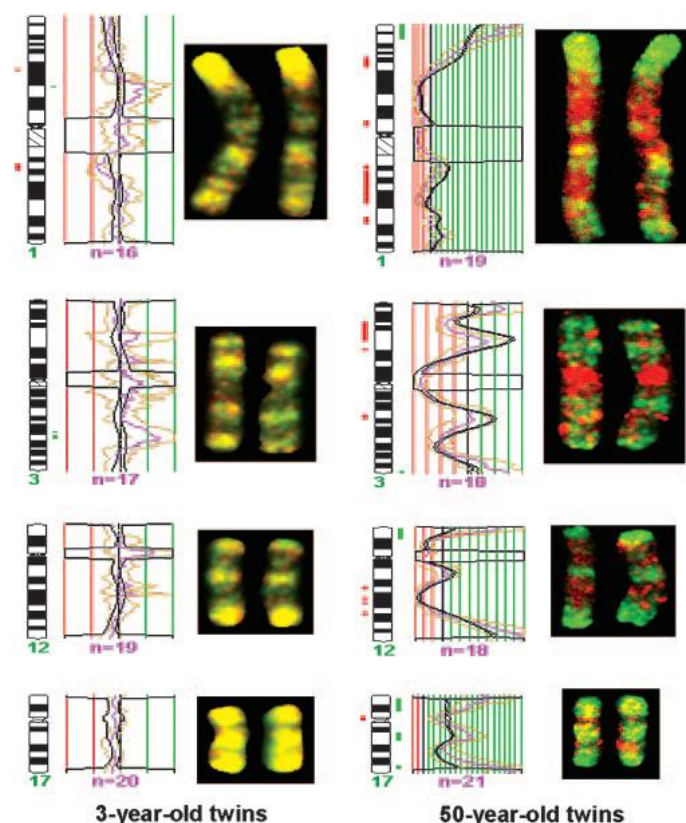
Monoalelická exprese se vyskytuje u 5-10% autozomálních genů. Dnešní studie potvrzují, že výběr alely, která bude aktivní je náhodný proces v různých buňkách, a proto hraje roli v epigenetických procesech a ne v zarodečné linii. V pokusech se využívá rozdílné hybridizace alel na jednonukleotidových polymorfismech (SNP). Výsledky se poté zpracovávají pomocí statistických metod. (*The American Journal of Human Genetics* 82, 1357-1360, June 2008 – *Monozygotic Twins Reveal Germline Contribution to Allelic Expression Differences*)

Epigenetické posuny jsou možná vodítkem k vyřešení záhady, proč psychiatrické nemoci nepostihují obě identická dvojčata.

Vědci zkoumali lymfocyty 40 párů MZ dvojčat. 65% dvojčat mělo epigenetické markery téměř stejné, nicméně u 35% dvojčat byly epigenetické změny spojeny s pozdějším věkem. Epigenetické rozdíly jsou velké u starších párů MZ dvojčat, pak u těch párů, které spolu nesdílely stejné vnější prostředí a u rozdílných zdravotních anamnéz. Výsledky této studie se využily v psychiatrii. Epigenetické změny nepochybně determinují proč některá dvojčata a sourozenci netrpí stejnými nemocemi a proč některá dvojčata trpí stejnou nemocí, ale v různém věku. (*Journal Watch Psychiatry August 17, 2005 –Emerging Perspectives:Epigenesis – How Experience Sculpts Genes*)

Podobná studie s jednovaječnými dvojčaty zkoumající vliv environmentálních vlivů na geny, zahrnovala 80 párů dvojčat od 3 do 74 let a ukázala, že nejmladší dvojčata mají málo epigenetických rozdílů. Počet rozdílů jednoznačně stoupá s věkem - U starších párů dvojčat se rozdíly v DNA metylaci CpG ostrůvků vyskytují 2,5 krát více než u mladších párů dvojčat. Využívají se metody metyl-senzitivní Southernovy hybridizace.

(www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0500398102 -*Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins*)



Obrázek 17: Mapování chromosomálních oblastí s různou DNA metylací u MZ dvojčat za použití komparativní genomické hybridizace. (Chromozomy 1,3, 12, 17, u padesátiletých dvojčat je mnohem více metylovaných oblastí DNA než u tříletých) , <http://www.pnas.org/content/102/30/10604.full>

Mezi další příklady genetických modifikací, které mají vliv na rozdílný průběh genetických chorob u MZ dvojčat je možné uvést:

Autismus – studie u MZ dvojčat objasnila, že má-li jedno dvojče autismus, druhé bude postižené s 60% pravděpodobností.

Alzheimerova choroba – pokud má MZ dvojče tuto nemoc, pravděpodobnost postižení druhého bude 60%.

Schizofrenie – pokud je jedno z MZ dvojčat postiženo schizofrenií, pravděpodobnost druhého je 48%, kromě genetických dispozic zde hrají roli i vnější vlivy. (http://is.muni.cz/th/98186/lf_d/PhD29.txt) K výzkumu schizofrenie u MZ dvojčat byla v jedné studii použita metoda RDA (representational difference analysis), která zahrnovala šest různých genomových částí, k prokázání rozdílů mezi páry MZ dvojčat diskordantních pro schizofrenii. Tato technika je extrémně sensitivní a efektivní k identifikaci nějaké mutace mezi identickými genomy. Identifikuje rozdíly v restričních fragmentech pomocí šesti setů

restrikčních enzymů. Výsledky této studie ale ukázaly, že z 12 různých RDA experimentů, hodnoty u MZ páru dvojčat nebyly větší než 50%. Diskordance MZ dvojčat pro běžné nemoci zahrnující i schizofrenii není možná bez definitivních výsledků, které nám do budoucna poskytnou nové genomové techniky. (*Journal of Medical Genetics* 2003;40:e16 – *Appraisal of genetic and epigenetic congruity of a monozygotic twin pair discordant for schizophrenia*)

Další studie se zabývala delečním syndromem 22q11 u MZ dvojčat s diskordancí fenotypu. Tento syndrom je způsobován delecí nebo ztrátou jedné kopie genu na 22. chromosomu, také se označuje jako **syndrom mikrodelece chromozomu 22q11**. Řadí se sem DiGeorgeův, velokardiofaciální, popř. Shprintzenův syndrom. Nedávné výzkumy MZ dvojčat s 22q11 delecí byly diskordantní pro fenotyp. V této studii bylo 5 párů ze 6 MZ dvojčat s delecí 22q11 diskordantních pro různé vlastnosti zahrnující srdeční, mentální a vývojové vlastnosti. Bohužel nejsou k dispozici žádná data týkající se metylace genů lokalizovaných v těchto regionech. (*Journal of Medical Genetics* 2002;39:e71-e71 – *Monozygotic twins with chromosome 22q11 deletion and discordant phenotypes: updates with an epigenetic hypothesis*).

Genetické změny jsou obvykle připisovány somatickým změnám (jako např. mosaikismus) pomocí nové nebo zděděné mutace. Zatímco vlivy vnějšího prostředí jsou přisuzovány rozdílům intrauterinního prostředí mezi dvojčaty.

5.2.3. VYUŽITÍ DNA POLYMORFISMŮ PAMĚŤOVÝCH B LYMFOCYTŮ V KOSTNÍ DŘENI

Vědci překpokládají, že za pomoci variabilních sekvencí DNA paměťových buněk B lymfocytů kostní dřene, budou moci rozlišit MZ dvojčata. Paměťová B buňka je transportována krevním řečištěm. Může být obsažena v krevních skvrnách na místě činu a porovnána s buňkami jednoho z páru dvojčat. Každá B buňka lymfocytu je obdařena protilátkovou specifitou, která koresponduje s počtem různých B buněk, které mohou vzniknout. Hlavním zdrojem protilátkové specifity je pravděpodobně rekombinace V,D, J elementů lokusu těžkého řetězce imunoglobulinu H (IgH). Úseky tohoto řetězce by měly být specifickými markery forenzní diferenciace mezi MZ dvojčaty. Je totiž nepravděpodobné, že by dva jedinci sdíleli stejnou kombinaci tohoto úseku. VDJ elementy jsou z B buněk získány PCR metodou a sekvenací. Vzhledem k velkému počtu variací VDJ sekvencí je falešný

výsledek nepravděpodobný. (*International Congress Series, Volume 1239, January 2003, pp.857-859(3) – Discrimination of monozygotic twins on the DNA level*)

5.2.4.DVOJČATA A FORENZNÍ DNA ANALÝZY

V případě, že identická dvojčata budou podezřelá z nějakého trestného činu, bude jen velmi obtížné určit, které z dvojčat daný čin spáchalo. Dostupné genetické analýzy jsou totiž v těchto případech nedostačující a ani zvyšování počtu markerů v komerčně dostupných kitech by nevedlo k jednoznačné identifikaci individuů jejichž biologický materiál je nutné porovnat. (http://scienceblogs.com/sciencetolife/2007/07/ask_a_scienceblogger_can_foren.php). Na základě tiskových zpráv je znám případ z března 2009, kdy berlínský soud musel propustit lupičská dvojčata, protože jim nebylo možné prokázat vinu na základě genetické analýzy DNA. Dvojčata byla obviněná z krádeže šperků a hodinek v hodnotě 160 milionů korun. Podle důkazů se jedno dvojče určitě loupeže účastnilo, ale nebylo možné určit které z nich to bylo. (<http://www.novinky.cz/koktejl/164445-soud-propustil-lupicska-dvojcata-nemohl-je-rozeznat.html>). V těchto případech mohou být genetické analýzy nahrazovány tradičními technikami jako je analýza otisku prstů. U identických dvojčat tato technika skýtá možný úspěch na vyřešení trestných činů. Kůže na špičkách prstů se rozrůžňuje a jako povrchová tkáň je v kontaktu s amniotickou tekutinou v děloze a s dalšími částmi plodu a dělohy. Konečná struktura prstů je dotvořena změnami a pohyby plodu. Makroskopické rozdíly umožňují rozeznat otisky prstů u dvojčat. (http://www.forensic-evidence.com/site/ID/ID_Twins.html)

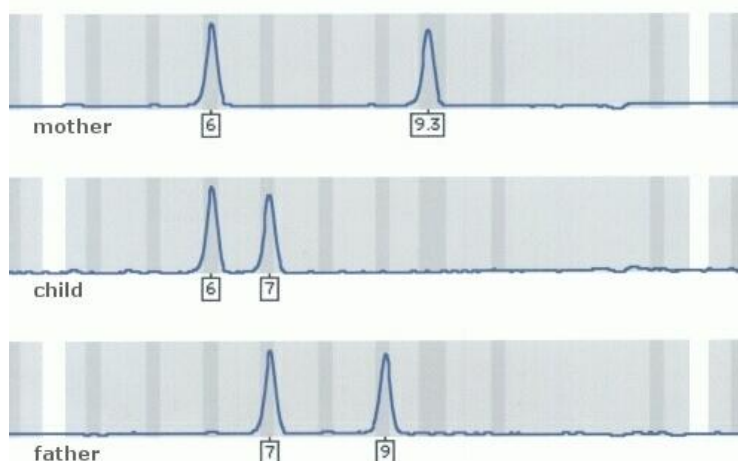
Další známý případ zapojení dvojčat do forenzní DNA analýzy se objevil v květnu 2007 v Missouri, kdy bylo třeba určit otcovství mezi identickými bratry. Bratři měli pohlavní styk se stejnou ženou. Po narození dítěte, bratr označený jako otec dítěte, požadoval paternitní test. V tomto případě, ale test nepomohl, neboť bratři jsou identická dvojčata a jejich shoda s daným dítětem byla u každého z nich 99,9%. Soud nakonec rozhodl, že otec dítěte zůstane bratr, kterého označila matka dítěte.

(<http://abcnews.go.com/TheLaw/LegalCenter/story?id=3195632&page=1>)

S novými technikami a výzkumy vzrůstá možnost vyřešení nejasných případů s MZ dvojčaty i v oblasti paternitního testování, kdy bylo využito specifických DNA metylových markerů k identifikaci parentálního původu alel. (*Indian Journal of Human Genetics, Vol.13, Issue 3, September-December 2007 – DNA profiling: Social, legal, or biological parentage*)

V paternitních testech, alely zděděné od otce (obligatorní gen OG) často nemohou být identifikovány. Proto je nezbytné vyvinout nové techniky, kterými by bylo možné určit parentální alely bez genealogických analýz. Vědci, za pomoci epigenetiky, se zabývají možnostmi použití specifických DNA metylových markerů (viz.výše) k určení parentálních alel za pomoci PCR metylační analýzy a typizační SNP techniky. Specifické metylované regiony jsou přítomny hlavně v CpG ostrůvcích přiléhající ke genům.

Využili imprintované jednonukleotidové polymorfismy (SNP) lokusu rs 220028 (A/G) jako modelový systém. Imprintované lokusy mateřské alely a otcovské alely jsou různě metylované. Např. u maternálně imprintovaného lokusu, jestliže je jedna alela metylována, měla by být zděděna od matky, druhá, nemetylovaná by měla být zděděna od otce. Analýzou PCR by měla být daná metylace alely určena. (*Forensic Science International 154 (2005) 122–127, Study on the application of parent-of-origin specific DNA methylation markers to forensic genetics*)



Obrázek 18: Paternitní test , <http://www.paternity.be/Images/Photos/paternityex1.jpg>

Horní obrázek ukazuje výsledek mikrosatelitního markeru paternitního testování, který zobrazuje vzorek od matky, prostřední obrázek je vzorek od dítěte a dolní obrázek je vzorek od otce. Matka se shoduje s dítětem v markeru 6, tzn. že druhý marker dítěte 7 musí být od otce, což se prokázalo.

7. ZÁVĚR

Genetická informace nesená molekulou DNA je relativně velmi stabilní v čase i prostoru. Díky tomu je DNA vhodný objekt charakterizace individuí, protože nezáleží na typu tkáně, který zkoumáme, ani na čase. V případě MZ dvojčat je však obtížné provádět individuální genetickou typizaci na základě standardních polymorfismů využívaných ve forenzní genetice, protože jednovaječná dvojčata jsou přirozeným klonem, tzn. mají shodný genetický základ, který je však exprimován na základě enviromentálních faktorů. Dvojvaječná dvojčata jsou naproti tomu dva jedinci genetičtí, kteří se vyvíjí v podobném prostředí. Mají polovinu společných znaků, tedy jako obyčejné sourozenecké páry. Někdy mohou vznikat i nestandardní typy jedinců, např. tzv. mozaiky, u kterých došlo ke změně genetické informace ve velmi raném stádiu vývoje nebo chiméry, které vznikly splynutím biologického materiálu dvou jedinců ve velmi rané fázi vývoje.

V současné době je velké množství studií dvojčat zaměřeno na změny dědičné informace, které vědci označují jako epigenetické. V minulosti se soudilo, že za dědičné sklony mohly jen změny v pořadí genetického kódu. Nyní se ale díky objevu epigenetických faktorů rozšiřuje pohled jak na vznik dědičných chorob, tak i na jejich diagnostiku a léčbu.

Studie dvojčat byly použity k odhadu genetických komponent v celé škále onemocnění zahrnujících medicínské a psychiatrické rysy, ale také psychologické a somatické fenotypy. Centrálním předpokladem těchto výzkumů je předpoklad, že MZ dvojčata vzniklá z jednoho oplozeného vajíčka jsou geneticky identická. V současné době však přibývá jednoznačných důkazů, že MZ dvojčata nejsou identická vždy, a že za rozdíly ve fenotypových projevech děděných genů pro různá onemocnění jsou odpovědné především epigenetické faktory bez nutnosti zapojení ante-natálních enviromentálních faktorů. Zůstává otázkou nakolik bude možné využít těchto poznatků i pro forenzně genetická zkoumání, která pracují především s nekodujícími oblastmi DNA, kde je však variabilita na úrovni DNA v případě MZ dvojčat při použití standardních metodik velmi nízká. Určité možnosti přináší výzkum dalších typů polymorfismů (především CNV), kde však bude nutné zavedení nových metodik, především celogenomového sekvenování.

7. SEZNAM LITERATURY

Biometrie a identita člověka ve forenzních a komerčních aplikacích; Autoři Rak, Roman, 1962- Matyáš, Vašek, 1970- Říha, Zdeněk, 1974- ; Vydáno Praha : Grada , 2008

Forensic DNA typing : biology & technology behind STR markers ; Autor Butler, John M.; Vydáno Amsterdam : Academic Press , c2001

Functional analysis of the human genome ; Autoři Farzaneh, Farzin Cooper, David N.; Vydáno Oxford : Bios Scientific Publishers , 1995

Genetika člověka; Autoři Ferák, Vladimír, 1938- Sršeň, Štefan, 1923-2006; Vydáno Bratislava : Slovenské pedagogické nakladatelstvo , 1990 Označení vydání 2. preprac. Vyd

Lidský genom na rozhraní tisíciletí; Autor Brdička, Radim, 1933-; Vydáno Praha : Grada , 2001

Úvod do molekulární biologie. Čtvrtý díl, Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie; Autor Rosypal, Stanislav, 1927- ; Vydáno Brno : Stanislav Rosypal , 2002

Variation in the human genome; Ciba Foundation Variation in the human genome, symposium (London, 1995) Vydáno Chichester [etc.] : John Wiley and Sons , 1996

Základy analytických metod v klinické molekulární biologii; Autor Průša, Richard, 1962-; Vydáno Praha : Univerzita Karlova. 2. lékařská fakulta , 1997

Alberts, Základy buněčné biologie 1998 B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter; vydáno Espero Publishing, 2.vyd., 2005

Venter et al. 2001, International Human Genome Sequencing Consortium (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome; Nature 431, 931-945 (21 October 2004) | doi:10.1038/nature03001; Received 29 July 2004; Accepted 7 September 2004

International Human Genome Sequencing Consortium (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome"; Nature. 2001 Feb 15;409(6822):860-921.

Anderson et al. 1981; Heterogeneity of tempo and mode of mitochondrial DNA evolution among mammalian orders; The Japanese journal of genetics Vol.64 , No.4(1989)pp.243-258

Twyman, Richard (1 August 2003). "Gene Structure". The Wellcome Trust, The Human Genome

H.Šimková, Forenzní genetika

Bartůňková, Paulík a kol., Vyšetřovací metody v imunologii; Grada Publishing 2005

Journal of Medical Genetics 2003, 40:e16; Appraisal of genetic and epigenetic congruity of a monozygotic twin pair discordant for schizofrenia – P.McDonald, M.Lewis, B.Murphy, R. O'Reilly, S.M.Singh

Journal of Medical Genetics 2002; 39:e71, Monozygotic twins chromosome 22q11 deletion and discordant phenotypes:updates with an epigenetic hypotesis – S.M.Singh, B.Murphy, R.O'Reilly

Machin GA (1996) Some causes of genotypic and phenotypic discordance in monozygotic twin pairs. *Am J Med Genet* 61,216–228

Human Reproduction Vol.21, No.8 pp.2175-2179, 2006 – Determination of twin zygosity using a commercially available STR analysis of 15 unlinked loci and the gender-determining marker amelogenin – a preliminary report

Machin G, Keith L. Biology of twins and other multiple pregnancies. In: Machin G, Keith L, editors. *Anatlas of multiple pregnancy: biology and pathology*. New York: Parthenon; 1999. p. 13– 24

Rogers et al. Monozygotic twins discordant for trisomy 21, *Journal of Medical Genetics*; 1982,11143-6

The American Journal of Human Genetics 82, 763-771, March 2008 – Phenotypically Concordant and Discordant Monozygotic Twins Display Different DNA Copy-Number-Variation Profiles; Carl E.G. Bruder,^{1,*} Arkadiusz Piotrowski,¹ Antoinet A.C.J. Gijbbers,^{2,3} Robin Andersson,⁴ Stephen Erickson,⁵ Teresita Diaz de Sta^ohl,⁶ Uwe Menzel,⁶ Johanna Sandgren,⁷ Desiree von Tell,¹ Andrzej Poplawski,¹ Michael Crowley,¹ Chiquito Crasto,¹ E. Christopher Partridge,¹ Hemant Tiwari,⁵ David B. Allison,^{1,5} Jan Komorowski,⁴ Gert-Jan B. van Ommen,^{2,3} Dorret I. Boomsma,⁸ Nancy L. Pedersen,⁹ Johan T. den Dunnen,^{2,3} Karin Wirdefeldt,⁹ and Jan P. Dumanski^{1,6}

Early Human Development 64 (2001) 105– 117, Mechanisms for differences in monozygous twins; Paul Gringras^{a, ,} Wai Chen^{b,c}

The American Journal of Human Genetics 82, 1357-1360, June 2008 – Monozygotic Twins Reveal Germline Contribution to Allelic Expression Differences; Vivian G. Cheung,^{1,2,3} Alan Bruzel,¹ Joshua T. Burdick,⁴ Michael Morley,² James L. Devlin,^{3,5} and Richard S. Spielman³

Journal Watch Psychiatry August 17, 2005 –Emerging Perspectives:Epigenesis – How Experience Sculpts Genes

International Congress Series, Volume 1239, January 2003, pp.857-859(3) – Discrimination of monozygotic twins on the DNA level

Indian Journal of Human Genetics, Vol.13,Issue 3, September-December 2007 – DNA profiling: Social, legal, or biological parentage

Forensic Science International 154 (2005) 122–127, Study on the application of parent-of-origin specific DNA methylation markers to forensic genetics; Guisen Zhao^{a,b,*}, Qingen Yang^a, Daixin Huang^a, Chunying Yu^a,Rongzhi Yang^a, Hui Chen^a, Kun Mei^a

Journal of Forensic Sciences, vol.39, Issue 4 (July 1994), *Paternity Identification in Twins with Differential Fathers*; Lu, HL, Wang, CX, Wu, FQ, Li, JJ

NGA Center for Best Practices; 202/624-5427, February 9, 2007 - *Improving Public Safety by Expanding the Use of Forensic DNA*

PNAS _ July 26, 2005 _ vol. 102 _ no. 30 _ 10413–10414; *Epigenetic drift in aging identical twins*; George M. Martin*

PNAS _ July 26, 2005 _ vol. 102 _ no. 30_10604–10609 ; *Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins*; Mario F. Fraga, Esteban Ballestar, Maria F. Paz, Santiago Ropero, Fernando Setien, Maria L. Ballestar, Damia Heine-Sun~er, Juan C. Cigudosa, Miguel Urioste, Javier Benitez, Manuel Boix-Chornet, Abel Sanchez-Aguilera, Charlotte Ling_, Emma Carlsson_, Pernille Poulsen, Allan Vaag, Zarko Stephan, Tim D. Spector, Yue-Zhong Wu, Christoph Plass, and Manel Esteller

Fraga MF et al. *Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Jul 26; 102:10604-9. *Emerging Perspectives: Epigenesis — How Experience Sculpts Genes*

San Francisco Daily Journal; Thursday, April 20, 1995 *DNA Untwisted*; Norah Rudin, Ph.D.

Perlman EJ, Steeten G, Tuck-Muller CM, Farber RA, Neuman WL, Blakemore KJ, et al. *Sexual discordance in monozygotic twins. Am J Med Genet* 1990;37:551– 7

Internetové zdroje:

http://actabp.pl/pdf/3_2001/587-598.pdf

<http://genetika.wz.cz/gen.htm>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Locus_\(genetics\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Locus_(genetics))

<http://cs.wikipedia.org/wiki/Gen>

http://actabp.pl/pdf/3_2001/587-598.pdf

<http://www.tribune.cz/archiv/mtr/204/5632>, *Medical Tribuni* 17/2008

<http://science.howstuffworks.com/genetic-science/dna-evidence.htm>

<http://genetika.wz.cz/clanky/clanek2.php>

<http://herkules.oulu.fi/isbn9514255674/html/x287.html>

<http://www.osel.cz/index.php?clanek=2720>

<http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=4401>

<http://www.gate2biotech.cz/variabilita-d-loopu-mitochondrialni-dna/>

http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/nemendelovska_dedicnost.htm

<http://www.gate2biotech.cz/variabilita-d-loopu-mitochondrialni-dna/>

<http://www.biopicka.cz/sluzby/molekularni-genetika/vyzkum-mtDNA.html>
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mitochondrial_genome_\(spanish\).PNG](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mitochondrial_genome_(spanish).PNG)
[http://en.wikipedia.org/wiki/Polymorphism_\(biology\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Polymorphism_(biology))
http://www.zsf.jcu.cz/struktura/katedry/kko/ucebni_texty/zaklady-genetiky-a-poradenstvi/10.pdf/
http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0602_89.pdf
<http://www.dnabaser.com/articles/SNP/SNP-single-nucleotide-polymorphism.html>
http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/repetitivni_dna.htm
http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/geneticka_kartografie.htm
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Alela>
[http://en.wikipedia.org/wiki/Locus_\(genetics\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Locus_(genetics))
<http://genetika.wz.cz/alely.htm>
<http://mygenetic.files.wordpress.com/2009/04/allele.jpg>
<http://wiki.lf1.cuni.cz/index.php/Fenotyp>
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Fenotyp>
<http://coturnix.wordpress.com/>
http://en.mimi.hu/biology/coding_sequence.html
<http://www.yeastgenome.org/help/glossary.html#cds>
http://cs.wikipedia.org/wiki/Nek%C3%B3duj%C3%ADc%C3%AD_DNA
http://www.eamos.cz/amos/bc/externi/bc_154/Markery_Milena.doc
<http://is.cuni.cz/studium/predmety/index.php?do=down&did=3975>
<http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/prezentace/genom.ppt>
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Mutace>
http://web.mvcr.cz/archiv2008/casopisy/kriminalistika/2002/02_02/makovec.html
<http://genetika.wz.cz/mutace.htm>
http://www.zbio.gnotobio.cz/2007/Molekularni_biologie/P7b_Molbiol_ZBio_2007_2008.pdf
<http://www.uoou.cz/uoou.aspx?menu=0&submenu=287&loc=290>
http://www.dnabased.com/DNA_a_urcovani_otcovstvi.htm
<http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>
http://www.gennet.cz/pages/dna_amniopcr.htm
http://en.wikipedia.org/wiki/Variable_number_tandem_repeat
http://www.tigis.cz/alergie/Alergie%2002_2006/WEB/PDF_web/10_macurova_web.pdf
http://en.wikipedia.org/wiki/Human_leukocyte_antigen
<http://en.wikipedia.org/wiki/Y-STR>

<http://www.waitegenealogy.org/dna.htm>
http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/genetika_komplexnich_znaku.htm
<http://en.wikipedia.org/wiki/Twins>
<http://en.wikipedia.org/wiki/Twin>
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Identical-fraternal-sperm-egg.png>
<http://www.studiolift.com/fetal/site/FMF-czech.pdf>
www.fnplzen.cz/data/prac/bory/spau/vyuka/doc/prednasky/vseob/Prehled_lidske_reprodukce_patologie.rtf
http://www.porodnice.cz/upload/prednasky-kurz5/Hajek_gemini_aktualni_stav_nasich_znalosti.ppt
<http://multiples.about.com/od/glossary/g/semiidentical.htm>
<http://www.osel.cz/index.php?clanek=2556>
http://www.img.cas.cz/mi/prednasky/Mother_fetus_interaction.ppt
<http://genetika.wz.cz/clanky/chimera.php>
<http://en.wikipedia.org/wiki/Xenograft>
<http://www.osel.cz/soubory/kabinet/omne5.ppt>
<http://www.studiolift.com/fetal/site/FMF-czech.pdf>
<http://osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=1349>
<http://osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=4230>
<http://epigenome.eu/en/1,4,0>
<http://www.washingtonpost.com/wp-dyn/content/article/2005/07/04/AR2005070400845.html>
<http://osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=3083>
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0500398102 -Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins
<http://www.pnas.org/content/102/30/10604.full>
http://is.muni.cz/th/98186/lf_d/PhD29.txt
http://scienceblogs.com/sciencetolife/2007/07/ask_a_scienceblogger_can_foren.php
<http://www.novinky.cz/koktejl/164445-soud-propustil-lupicka-dvojcata-nemohl-je-rozeznat.html>
http://www.forensic-evidence.com/site/ID/ID_Twins.html
<http://abcnews.go.com/TheLaw/LegalCenter/story?id=3195632&page=1>
<http://www.paternity.be/Images/Photos/paternityex1.jpg>

